MICRUE SEARCH SINDER DOMAIN FARMESE

1/1

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number:

09-121865

(43)Date of publication of application: 13.05.1997

(51)Int.CI.

C12N 15/09 C07H 21/04 C07K 14/705 C12N 1/21 C12P 21/02 G01N 33/566 // A61K 38/00 A61K 39/395 A61K 48/00 C12Q 1/68 (C12N 1/21 C12R 1:19

(21)Application number : 07-303301

(71)Applicant: TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing:

30.10.1995

(72)Inventor: HINUMA KUNIJI

FUKUZUMI MASASHI

ITO YASUAKI FUJII AKIRA

(54) NEW G-PROTEIN-COUPLED TYPE RECEPTOR PROTEIN, ITS PRODUCTION AND USE THEREOF

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To produce the subject protein derived from a human brain and human lungs and useful for development, etc., of medicines containing a receptor agonist or antagonist.

SOLUTION: This guanine nucleotide-binding protein (G-protein)-coupled type receptor protein derived from a human brain and human lungs or its salt or further a partial peptide of the G-protein coupled type receptor protein or its salt comprises the same or the substantially same amino acid sequence as that of formula I or II. The G-protein coupled type receptor protein is obtained from a tissue of a warm-blooded animal or its cell according to a well-known method for purification.

Wil her gla teu The The Ben fon geo Gle The Gre Las Maj ite Aid .96 ASB ARB Alm Sen hat Gle The The Tan San Ten Aid And Red Chy Jeu 230 And 1284 230 And 1284

Ser Ya. Yal Alia Leu Tar Tas Aap Leu Fiji Sin Thr Fre Lou Faji De 135 260 501 505 Ser Bet Set Tyr Vel 314 Tar 3er 1eu Ser Tyr Alia Asi Aar Cys Leu 210 223 223

П

Ι

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1-

ang mentang menggapan ang terlegi mentang mentang menggapan penggapan di kebalang ang kelalang ang kelalang di Kebabagai Sa

and the second of the second o

(19)日本国特許庁 (JP) (1

(12) 公開特許公報(4)

(II)特許出頭公開番号 (II)特许出頭公開番号 (II)

特開平9-121865

(43)公開日 平成9年(1997)5月13日

技術表示箇所						元件 可に按<			大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号		7番地の9 武			17番地の6 ロ			地の16	
	ZNAA	æ			ပ	(全 34 耳)		权会社	中央区道修町		時日17目	402号		14大3TE	EX302F		Xヶ丘町36番	田中
FI	C12N 15/00	C07H 21/04	C 0 7 K 14/705	C12N 1/21	C12P 21/02	未耐水 耐水項の数13 FD (全 34 頁)	(71) 出版人 000002934	武田薬品工業株式会社	大阪府大阪市	(72)発明者 日稻 州司	茨城県つくば市春日1丁目7番地の9	田春日ハイツ1402号	(72)発明者 福住 昌司	茨城県つくば市並木3丁目17番地の6	イヤルシティ並木302号	(72)発明者 伊藤 康明	茨城県土浦市松ヶ丘町36番地の16	(74)代理人 弁理士 水野 昭宜
广内整理番号	9162-4B					客査開求		/	A30B								•	
数别配号	ZNA						特國平7-303301		平成7年(1995)10月30日									
(51) Int.Cl.*	C12N 15/09	C07H 21/04	C 0 7 K 14/705	C12N 1/21	C12P 21/02		(21) 出版番号		(22) 出質日									
(51) Int.C.*																		

(54) 【発明の名称】 新規C蛋白質共役型レセブター蛋白質、その製造法および用途

股件頁に嵌く

(57) 【契約】 (修正有) 【製題】新規 C蛋白質共役型レセプター蛋白質、その製置だおよび用途の設備。 「解決手段」と下脳由来及びと下師由来のG蛋白質共役型レセブター蛋白質またはその塩、核G蛋白質共役型レセブター蛋白質の部分ペプチド、核G蛋白質共役型レセブター蛋白質をコードするDNA、核C蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドと核C蛋白質は役型レセブター蛋白質に対するリガンドの決定方法、リガンドを核C蛋白質は役型レセブター蛋白質との結合性を変化させる化合物のスクリーニング方法またはスクリーニング用キット、核スクリーニング方法またはその基、核化合物またはその塩を含有する医域組成物、核蛋白質共役型レセブター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体。

【特許額求の

[柳永頃1] 配列番号:1または配列番号:2で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸四列を含有することを特徴とするC蛋白質共役型レープター蛋白質もしくはその塩または終5番戸質井や型レ

MLVAとおりらしておりなりのご知日知れ役型でも グー語の質をしくはその過または核に蛋白質状役型レ セプター語の質の部分ペプチドもしくはその塩。 「翻状質2」 額水項 1 記録のC 蛋白質状役型レセプタ 一語の質またはその部分ペプチドをコードする塩類配列 を有するDNAを含有するDNA。

【柳求項3】 配列番号:3または配列番号:4で装わされる塩基配列を有する脚水項2記録のDNA。 【柳求項4】 崩求項2または3記録のDNAを含有す

ることを特徴とするベクター。 【精決項5】 - 精求項4記載のベクターを保持する形質 「胡永項6」 胡求項5記載の形質転換体を始独し、形質転換体に6蛋白質またはその部分ペプチドを生成せしめることを特徴とする結束項・記載の6蛋白質共役型レセプター蛋白質もし、ほその塩またはその質またはその超分ペプチドもしくはその塩の製造方法。

記載のC蛋白質状役型レセプター蛋白質もしくはその またはその部分ペプチドもしくはその塩の製油方法。 「翻水項 7】 翻水項 1記載のC蛋白質状役型レセプタ 一蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしく はその塩と、試験試料とを接触させることを特徴とする 翻水項 1配載のC蛋白質共役型レセプター蛋白質もしく はその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に対す るリガンドの決定方法。

【静求項8】 (1) はアター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチド もしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と^{*}(11) は次の塩に、リガンドを接触させた場合と^{*}(11) は次の塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に、リ ガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行 なうことを特徴とするリガンドと請求項 ! 配載の G 蛋白 質共役型レセプター蛋白質 もしくはその塩またはその部 がイプチドもしくはその塩またはその部 物またはその塩のスクリーニング方法。

[0002]

「翻球項9」 翻球項1記載のC蛋白質其役型レセブター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩を含有することを特徴とする、リガンドと翻球項1記載のC蛋白質共役型レセブター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キ

【胡米項10】 胡米項1記録のG蛋白質共役型フセンター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に対するが体。

「簡本項11] 請求項8記載のスクリーニング方法または都来項9記載のスクリーニング用キットを用いて得られるG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンシュニュ

特朗平9-121865

8

【胡求項12】 「胡求項2配扱のDNAをプライマーあるいはプロープとして用いてクローニングされかつG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【胡求項13】 胡求項2記級のDNAをプライマーあるいはプロープとして用いてクローニングされたDNAによりコードされたC蛋白質状役型レセプター蛋白質またはその塩あるいは該C蛋白質状役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。

[発明の詳細な説明] [0001]

数共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコ セプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチド 【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト監及びヒト肺 の塩またはその部分ペプチドもしくはその塩、核C蛋白 もしくはその塩の製造方法、核G蛋白質共役型レセプタ 白質共役型レセプター蛋白質あるいはその発現細胞を用 いることを特徴とするリガンドとの結合性を変化せしめ 由来の新規C蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはそ 一ドするDNAを含有するDNA、核G蛋白質共役型レ の用途、核C蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいはそ の発現細胞を用いるリガンドの測定方法、および核C蛋 る性状を有するレセプターアゴニストまたはアンタゴニ ストのスクリーニング方法、眩スクリーニングのための キット、核スクリーニング方法で得られたアゴニストま **一蛋白質(またはその部分ペプチド)およびそのDNA** たはアンタゴニスト、さらに数アゴニストまたはアンタ ゴニストを含有する医薬に関する。

【従来の技術】多くのホルモンや神経伝速物質は細胞限 に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の越 能を調節している。これらのレセプター蛋白質の多くは 其役している guanine mucleotide-binding protein 以下、G蛋白質と略称する場合がある)の活性化を通 じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の設質通 筒域を有する共通した構造をもっていることから、C蛋 白質状役型レセプター蛋白質あるいは7回設質値型レセ ブター蛋白質と総称される。G蛋白質状役型レセプター 蛋白質は生体の細胞や疑認の各機能細胞表面に存在し、 それら生体の細胞や疑認の機能を調節する分子、例えば

ホルモン、神経伝建物質および生理活性物質等の様的として非常に面要な役割を担っている。 [0003] 各領生体の知識や短器の内の複雑な機能を 即節する物質と、その特異的レセブター、特にはそれら で発現する特異的なて蛋白質丼役型レセブター、特にはそれら で発現する特異的なて蛋白質丼役型レモブター、 の関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の 機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品間発 に非常に面質な手段を提供することとなる。例えば、脳 などの中枢神経系の器官では、多くのホルモン、ホルモ ン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによ

れぞれに対応するレセプターを通してその生理機能の調 る。特に神経伝達物質は脳内の様々な部位に存在し、そ る関節のもとで脳の生理的な機能の関節が行われてい これまで報告されていないものも多いと考えられる。さ 節を行っている。脳内には未だ未知の神経伝達物質も多 などの呼吸器系の器官でも、多くのホルモン、ホルモン かどうかについても分かっていなかった。さらにまた肺 らに、既知のレセプター蛋白質のサブタイプが存在する 存在し、血圧、呼吸活動等のそれぞれに対応するレセブ いる。特に肺ではこれらの生理活性物質などが種々多く 調節のもとで呼吸器系の生理的な機能の調節が行われて 植物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質などによる は未知の生理活性物質なども多く存在すると思われ、当 ターを通してその調節機能を果たしている。また、肺で 然そのレセプター蛋白質 c D N A の構造に関しても、こ に、呪知のレセプター蛋白質のサプタイプが存在するこ れまで報告されていないものも多いと考えられる。さら そのレセプター蛋白質cDNAの構造に関しても、

医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプタ にすることは、これまた医薬品開発に非常に重要な手段 節する物質と、その特異的レセプターとの関係を明らか った。さらに肺などの呼吸器系における複雑な機能を調 で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明 くスクリーニングし、医薬品を開発するためには、脳内 一蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よ その特異的レセプターとの関係を明らかにすることは、 レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニスト である。特に肺などの呼吸器系の機能を調節するための し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であ 【0004】脳における複雑な機能を調節する物質と、 は、肺で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能 を効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するために を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必

発明者らがこれらのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を

蛋白質の製造方法および核蛋白質およびDNAの用途等 質、該蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、該 およびヒト肺由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白 画、核G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩 質転換された宿主、該形質転換体から得られた細胞膜分 DNA、該DNAを含有するベクター、該ベクターで形 またはその部分ペプチドをコードするDNAを含有する ドもしへはその塩、核G蛋白質共役型レセプター蛋白質 レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチ を提供するものである。本発明は、新規C蛋白質共役型 **[発明が解決しようとする課題]本発明は、ヒト脳由来** またはその部分ペプチドもしくはその塩の製造方法、該 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその発現細胞 [0005]

役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスク セプター蛋白質またはその発現細胞を用いるC蛋白質共 リーニング方法、核スクリーニング用キット、核スクリ ターに対するリガンドの測定方法、該G蛋白質共役型レ セイ技術、核G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそ ストまたはアンタゴニストを含有する医薬、核G蛋白質 のDNAの用途などを提供するものである。 型レセプター蛋白質あるいはその抗体を用いた免疫アッ 共役型レセプター蛋白質に対する抗体、核C蛋白質共役 ト、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するアゴニ ーニングにより得られたアゴニストまたはアンタゴニス

索する方法が行われるようになった。本発明者らは、 CRと略称する)法によって新規レセプター蛋白質を探 リアクション (Polymerase Chain Reaction :以下、P 似性を示すことを利用して、ポリメラーゼ・チェーン・ セプター蛋白質が、その構造の一部にアミノ酸配列の類 り効率的に単程するための合成DNAプライマーを合成 造を決定することに成功した。これらのC蛋白質共役型レセプター蛋白質 c D N A は、既知のC蛋白質共役型レ 蛋白質をコードするcDNAを単離し、その部分的な棉 ヒト姉由来のcDNAを増幅し、その解析を進めた。 し、核プライマーを用いてヒト脳由来のcDNAおよび 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをよ れ、さらにヒトで機能発現している新規のG蛋白質共役 の結果、本発明者らは、新規C蛋白質共役型レセプター 【課題を解決するための手段】近年、G蛋白質共役型レ 型レセプター蛋白質をコードしていると考えられた。本 セプターと、DNAおよびアミノ酸の相同性が認めら

(核形質転換体を含む) を用いる 6 蛋白質共役型レセプ いることが示唆される。これらのことから、これらのレ ヒト脳およびヒト肺より単離したことにより、これらの およびヒトの肺において発現し、何らかの働きを担って G蛋白質共役型レセプター蛋白質はそれぞれヒトの脳内 いてヒト組織や細胞からヒト由来のcDNAをクローニ いれば、完全長の翻訳枠を持つcDNAを入手すること セプター蛋白質は、それぞれヒトの脳内およびヒトの胼 また核 c DNAをプライマーあるいはプローブとして用 ができ、該レセプター蛋白質を製造することもできる。 で発現し、機能していると考えられる。このDNAを用 リガンドとレセプター蛋白質との結合を促進する化合物 ることができる。さらには、リガンドとレセプター蛋白 標に、生体内あるいは天然・非天然の化合物などから該 実験または細胞内セカンドメッセンジャーの測定等を指 させた該レセプター蛋白質を用いれば、レセプター結合 プター蛋白質をコードする c D N A を適当な手段で発現 ングすることもできる。さらに、核C蛋白質共役型レセ 質との結合性を変化させる化合物、例えば、リガンドと レセプター蛋白質との結合を阻密する化合物、あるいは レセプター蛋白質に対するリガンドをスクリーニングす

列をアミノ酸配列(配列番号:1)に翻訳したところ た、増幅されたcDNAのサイズも、既知のG蛋白質丼 通領域が疎水性プロット上で確認された〔図2〕。ま 白質共役型レセプター蛋白質であるとトのソマトスタチ としてデーターベース検索を行ったところ、公知のご蛋 であった。本発明者らは、このDNAの塩基配列を鋳型 役型レセプター蛋白質と比較して同程度の約7:00bp ソマトスタチンレセプター・サプタイプ2 (P3087 ンレセプター・サプタイプ1:(P30.872)、とトの なcDNA断片として〔図4〕に示すものをPCR法に cession Numberと呼ばれるものである。 にデータとして登録される際の整理番号であり、通常Ac 3)。上記の()内の略語は、NBRF-PIR/Swiss-PROT %、37%および41%のホモロジーが認められた (図 プ3 (P32745) とそれぞれアミノ酸配列で36 4) およびヒトのソマトスタチンレセプター・サブタイ [図1]、第2、第3、第4、第5、第6及び第7膜買 ることが明らかになった。この配列をアミノ骸配列(配 ら、該cDNAが新規レセプター蛋白質をコードしてい よって増幅し、サブクローニングし、その配列の解析か サイズも、既知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質と比 第4、第5、第6及び第7膜質通領域が疎水性プロット 列番号:2) に翻訳したところ [図4] 、第2、第3、 較して同程度の約700bpであった。本発明者らは、 上で確認された(図5)。また、増幅されたcDNAの 【0008】 さらに、本発明者らは、ヒト肺由来の新規 タチンレセプター・サブタイプ1 (P30872) とそ 2 (P30874)、ヒトのソマトスタチンレセプター 質であるヒトのソマトスタチンレセプター・サブタイプ を行ったところ、公知のC蛋白質共役型レセプター蛋白 このDNAの塩基配列を鋳型としてデーターベース検索 れぞれアミノ酸配列で38%、41%および39%のホ の整理番号であり、通常Accession Numberと呼ばれるも は、MBRF-PIR/Swiss-PROT にデータとして登録される際 モロジーが認められた〔図6〕。上記の()内の略語 ・サブタイプ3 (P32745) およびヒトのソマトス

るいは該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチ とするC蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩あ たは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴 または配列番号:2で表わされるアミノ酸配列と同一ま ドまたはその塩、(2)第(1)項記根のG蛋白質共役 【0009】すなわち、本発明は、(1)配列器号:1

などのスクリーニングを行なうこともできることを見い 列番号:3または配列番号:4で表わされる塩基配列を

得られた配列の解析から、該 c D N A が新規レセプター CR法によって増幅し、サブクローニングし、そうして 来の新規なcDNA断片として【図1】に示すものをF 蛋白質をコードしていることが明らかになった。この配 【0007】より具体的には、本発明者らは、ヒト脳由

蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはの部分ペプチドもしくはその塩の製造方法、(7)第

のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩また 験試料とを接触させることを特徴とする第(1)項記載 はその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩と、試 .(1) 項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしく

はその部分ベプチドもしくはその塩に対するリガンドの

G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチ 転換体、・(6) 第(5)項記載の形質転換体を培養し、

ドを生成せしめることを特徴とする第 (1) 項記載のG

プチドもしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と 役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分へ 塩を含有することを特徴とするリガンドと第(1)項記 質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその させる化合物またはその塩をスクリーニングする方法、 たはその部分ペプチドもしくはその塩との結合性を変化 歳のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩ま 比較を行なうことを特徴とするリガンドと第(1)項記 塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との 質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその 决定方法、 【0010】(8)(1)第(1)項記殻のG蛋白質共 白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはそ させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット (10)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター) たはその部分ペプチドもしくはその塩との結合性を変 級のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩ま (ii) 第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白 (9)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白

番号:1 で表わされるアミノ酸配列、配列番号:1 で表 はその塩あるいは該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の 部分ペプチドまたはその塩を提供する。 【0011】より具体的には、(14)蛋白質が、配列

わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸

いはプロープとして用いてクローニングされた DNAに よび (13) 第 (2) 項記報のDNAをプライマーある ードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、お ーニングされかつG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコ DNAをプライマーあるいはプロープとして用いてクロ

よりコードされたG蛋白質共役型レセプター蛋白質また

ストまたはアンタゴニスト、(12)第(2)項記載の ットを用いて得られるG蛋白質共役型レセプターアゴニ ニング方法または第(9)項記載のスクリーニング用キ の塩に対する抗体、(11)第(8)項記載のスケリー

型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドをコードす る塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(3)配

有する第 (2) 項記載のDNA、 (4) 第 (2) または

ター、(5)第(4)、項記載のベクターを保持する形質

(3)項記載のDNAを含有することを特徴とするベク

£

のアミノ酸)が付加したアミノ敵配列、あるいは配列番 表しくは1個以上20個以下、より好ましくは1個以上 以上のアミノ敬 (好ましくは1個以上30個以下、さら 以上のアミノ敬(好ましくは1個以上30個以下、さら に好ましくは1個以上20個以下、より好ましくは1個 または2個以上のアミノ酸(好ましくは1個以上30個 国以上20個以下、より好ましくは1個以上10個以下 のアミノ酸)が欠失したアミノ酸配列、配列番号:1で **扱わされるアミノ酸配列に1または2個以上のアミノ酸** 号:1で表わされるアミノ敬配列中の1または2個以上 のアミノ敬(好ましくは1個以上30個以下、さらに好 ミノ做配列を含有する蛋白質である第(1)項記載のG 蛋白質が、配列番号:2で表わされるアミノ酸配列、配 **列番号:2で表わされるアミノ敬配列中の1または2個** に好ましくは1個以上20個以下、より好ましくは1個 配列番号:2で表わされるアミノ酸配列に1または2個 しくは1個以上10個以下のアミノ酸)が他のアミノ酸 その塩、 (16) リガンドがアンギオテンシン、モンベ ゲルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチ (好ましくは1個以上30個以下、さらに好ましくは1 **聞以上20個以下、より好ましくは1個以上10個以下** 0個以下のアミノ做)が他のアミノ敵で留換されたア 以下、さらに好ましくは1個以上20個以下、より好ま (1) 項記載のC蛋白質共役型レセプター蛋白質または (好ましくは 1 個以上30個以下、さらに好ましくは 1 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、(15) あるいは配列番号:2で扱わされるアミノ酸配列中の1 シン、 ボンムシン、 カナアノイド、 コフッストキニン、 以上10個以下のアミノ酸)が付加したアミノ酸配列、 以上10個以下のアミノ酸)が欠失したアミノ酸配列、 で悩換されたアミノ敵配列を含有する蛋白質である第

それらのファミリー構成員などである第(6)項配破の 【0012】 (17) 標故したリガンドを第(1) 項記 似の G 蛋白質共役型 レセプター蛋白質 もしくはその塩ま Jガンドの決定方法、

似のC蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩ま たはその部分ペプチドもしくはその塩に狡触させた場合 における、整観したリガンドの第(1) 煩配做のG 蛋白 **囡共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部** 分ペプチドもしくはその塩に対する結合虽を測定し、比 較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載のG **蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはそ** の部分ペプチドもしくはその塩との結合性を変化させる 化合物またはその塩のスクリーニング方法、(18) 様 蹴したリガンドを第(1)項記載のG蛋白質共役型レセ プター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドも しくはその塩を含有する細胞に接触させた場合と、椋徹 したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記載のC蛋 白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその 部分ペプチドもしくはその塩を含有する細胞に接触させ た場合における、模倣したリガンドの核細胞に対する結 **合盘を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第** 標準したリガンドおよび試験化合物を第(1)項記 はその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩との枯 合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング 方法、(19)模型したリガンドを第(1)項配載のG 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはそ を含有する細胞の関画分に接触させた場合における、概 し、比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記 (1) 項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしく の部分ペプチドもしくはその塩を含有する細胞の駁画分 に接触させた場合と、概觀したリガンドおよび試験化合 物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質 もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩 **蹴したリガンドの核抑胞の膜画分に対する結合屈を測定** たはその部分ペプチドもしくはその塩との結合性を変化 観のC蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩ま させる化合物またはその塩のスクリーニング方法

その部分ペプチドもしくはその塩との結合を阻害する化

合物またはその塩のスクリーニング方法、(23)類

G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または

【0013】(20) 標識したリガンドを第(5) 項記 **観の形質転換体を培養することによって販形質転換体の** 細胞限に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質ある ガンドおよび試験化合物を第(5)項記載の形質転換体 たG蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいはその部分ペ プチドに接触させた場合における、概甑したリガンドの いはその部分ペプチドに接触させた場合と、模蔵したリ 眩 C 蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプ 一蛋白質あるいはその部分ペプチドとの結合性を変化さ 1) リガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセブ ター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもし を培養することによって核形質転換体の細胞膜に発現し チドに対する結合量を測定し、比較することを特徴とす るリガンドと第(1)項記載のG蛋白質共役型レセブ せる化合物またはその塩のスクリーニング方法、(2

8, GROa, GROß, GROy, NAP-2, EN

A-78, PF4, 1P10, GCP-2, MCP-

ン、アドレナリン、aおよびβ-chemokine (1L-ン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシ

MIP-IB, RANTES&E), エンドセリン, エ

I, HC14, MCP-3, I-309, MIP1a,

ソテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、T

RH、パンクレアティックボリペプタイド、ガシニン、

ド リレイテッド ペプチド)、ソマトスタチン、ド

ーパミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン、CGR P (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド)、ア

ドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチ

ドヤ、オピオイド、プリン、パンプレッシン、オキシト

(ン、VIP (パンアクティブ インテスティナル ア

(1) 項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしく くはその塩との結合性の変化が、核リガンドと絃第

8

たはその部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合

卣球、リンパ球、グリア細胞、線維芽細胞、角化細胞、

S

はその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩との結 台を阻害するものあるいは促進するものであることを特 **聞とする第(8)頃、及び第(17)項~第(20)項** のいずれか一記載のスクリーニング方法、(22) 第

特開平9-121865

©

貿共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部 場合と、第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋 白質もしくはその塩を活性化する化合物および試験化合 物を第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質 はその塩を活性化する化合物を第(1)項記載のG蛋白 もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩 分ペプチドもしくはその塩を含有する細胞に接触させた 比較することを特徴とするリガンドと第(1)項記載の (1) 項記録のC蛋白質共役型レセプター蛋白質もしく を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共 役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペ プチドもしくはその塩を介した細胞刺激活性を測定し、

セプター蛋白質あるいはその部分ペプチドを介する細胞 (1) 項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしく はその塩を活性化する化合物を第(5)項記破の形質転 現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいはその部 換体を培養することによって歓形質転換体の細胞膜に発 分ペプチドに接触させた場合と、第(1)項記載のC蛋 白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩を活性化す る化合物および試験化合物を第(5)項記載の形質転換 体を培養することによって核形質転換体の細胞膜に発現 したG蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいはその部分 ペプチドに接触させた場合における、 G 蛋白質共役型レ 刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンド と第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質も しくはその植またはその部分ペプチドもしくはその植と の結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング

CP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, 1-3 【0014】 (24) 第 (1) 項記載のG蛋白質共役型 レセプター蛋白質もしくはその塩を活性化する化合物が イド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メ -chemokine (1 L-8, GROa, GROß, GRO パンプレッシン、オキシトシン、VIP (パンアクティ ブ インテスティナル アンド リレイテッド ペプチ ド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリ y, NAP-2, ENA-78, PF4, 1P10, G ン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリフ ーティッドペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコト ロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、ロおよびB アンポキャンシン、ホンスシン、ボンスシン、セナハン リエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジン、ト ラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、

で得られる化合物またはその塩、(26)第(11)項 どである類 (17) 項一類 (23) 項記収のいずれかの 钺の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医 組成物、(29) 第(25)項記載の化合物またはその ン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックボ リペプタイド、ガラニン、それらのファミリー构成員な 記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする 医薬組成物、(27)第(1)項または第(13)項記 原組成物、 (28) 類 (2) 項または第 (12) 項記載 のDNAまたはその塩を含有することを特徴とする医薬 質~第(23)項記載のいずれかのスクリーニング方法 スクリーニング方法、(25) 第(8)項、第(17) ど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミ 09, MIPIA, MIP-1B, RANTEST 塩を含有することを特徴とする医薬組成物、

【0015】 (30) 第 (1) 項記載のC蛋白質共役型 もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩 レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチ ドもしくはその塩を含有する細胞を含有することを特徴 とする第 (9) 項記載のスクリーニング用キット、(3 1)第(1)項記載のC蛋白質共役型レセプター蛋白質 を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする第 塩、(33)第(32)項記載の化合物またはその塩を (9) 項、第 (30) 項または第 (31) 項記収のスク リーニング用キットを用いて得られる化合物またはその 含有することを特徴とする医薬組成物、(34)第(1 0) 項記載の抗体と、第(1)項記載のG蛋白質共役型 レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチ (1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしく はその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩の測定 方法、(3 5)第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプ ター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもし くはその塩を含有することを特徴とする細胞またはその 細胞膜画分、 (36) 第 (2) 項配破のDNAをプライ マーまたはプローブとして用いることを特徴とするDN A ライブラリーから G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を る上記項 (36) 項記載のDNAをスクリーニングする 脂肪粗糙、膀胱、角膜、嗅球、骨髄、羊膜などが挙げら コードする塩基配列を有する DNA をスクリーニングす **細胞由来のcDNAライブラリーであることを特徴とす** (9) 項記載のスクリーニング用キット、(32) 第 る方法、(37) DNAライブラリーが、ヒトの組織・ ドもしくはその塩とを後触させることを特徴とする第 **版、賴散、脾賦、心賦、平清筋、間、血管、食、肾虚、** 皮尚、胎児、乳腺、卵巢、精漿、下垂体、障礙、頭下 限、脊椎、前立腺、胃、甲状腺、気管、骨格筋、子宮、 方法、および(38)ヒトの組織の例としては、即腎、 崎帯、脳、舌、肝臓、リンパ腺、肺、胸隙、胎盤、阪 れ、ヒトの細胞の例としては、神経細胞、上皮細胞、

特徴とする第(2)項記載のDNAの少なくとも一部に 記載のDNAにハイブリダイズすることのできることを の部分ペプチドもしくはその塩に対するモノクローナル 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはそ ンスDNAおよびRNA、(40)第(1)項記載のG 相補的な塩基配列を含有することを特徴とするアンチセ 物、(42)(1)上記第(10)項、第(40)項あ くはその強に対する精製されたポリクローナル抗体超数 ター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもし 抗体、(41)第(1)項記殻のG蛋白質共役型レセプ 【0016】さらに、本発明は(39)上記第(2)項 物を検出することを特徴とするC蛋白質共役型レセプタ るいは第(41)項記載の抗体と測定すべき試料とをイ の部分ペプチドもしくはその塩と測定すべき試料とをイ 定アッセイ法、(43)(1)上記算(1)項記載のG 一蛋白質またはその部分ペプチドの検知のための免疫剤 (11)上記第(1)工程で形成された抗原・抗体複合 物を検出することを特徴とするG蛋白質共役型レセプタ ンキュベーションし、抗原・抗体複合物を形成せしめ、 蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはそ ンキュベーションし、抗原・抗体複合物を形成せしめ、 ための免疫測定アッセイ法、(44)医薬として許容さ 一蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体の検知の 0の塩基配列を含有することを特徴とする上記第(3 載のアンチセンスDNAおよびRNA、(45)2~5 れる担体中にあることを特徴とする上記第(39)項記 (11)上記第(1)工程で形成された抗原・抗体複合 の部分ペプチドの活性を制御・関節する方法、(47) を特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはそ 部分ペプチドを発現している細胞とを接触せしめること RNAと、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその 6) 上記算(39)項記載のアンチセンスDNAまたは 9) 項記載のアンチセンスDNAおよびRNA、(4 るDNAとを接触せしめることを特徴とするC蛋白質共 ベプチドをコードする塩基配別を有するDNAを含有す Aと、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分 現を制御・調節する方法、(48)上記第(28)項記 役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの機能発 上記第(39)項記載のアンチセンスDNAまたはRN び(49)(1)上記第(1)項記載のC蛋白質共役型 することを特徴とする第(1)項記載のC蛋白質共役型 概のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分へ レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチ プチドをコードする DNAもしくはその塩を偏体に投与 ドもしくはその塩の欠乏症の改善あるいは治療方法、及 レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチ

> もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩 する第(1)項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質 v) 該永代培養可能な細胞を生育せしめることを特徴と を産生する永代培養可能な細胞を選択し、そして() た個体から得られた細胞を永代培養可能ならしめ、() ドもしくはその塩で個体を免疫し、(11)核免疫され に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ ii) G蛋白質共役型レセプター蛋白質と反応する抗体 の生産方法を提供する。

に同一な質技物としては、そのアミノ酸が属するところ されるであろう。核アミノ酸紀列中のアミノ酸の実質的 るいは挿入のされていないものと実質的に同一であると 挿入を施されたポリペプチドは、そうした置換、欠失あ 生ぜしめないし、こうした場合その窓換、欠失あるいは ペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化を る。アミノ酸の閻換、欠失あるいは挿入はしばしばポリ 生理的な特性などが、実質的に同じであることを意味す 一」とは蛋白質の活性、例えば、リガンドの結合活性、 【発明の実施の形態】本明細暦において、「実質的に同 [0017] る。非極性(疎水性)アミノ敵としては、アラニン、ロ のクラスのうちの他のアミノ敵類から選ぶことができう る。 極柱 (中件) アミノ酸としては、グリシン、セリ ラニン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられ イシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルア ン、スレオニン、システイン、チロシン、アスパラギ しては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられ ンなどが挙げられる。負電荷をもつ(酸性)アミノ酸と 住) アミノ酸としては、アルギニン、リジン、ヒスチジ ン、ゲルタミンなどが挙げられる。隔間荷をもつ(塩基

ヌ、サル、ヒトなど)のあらゆる組織(例えば、下垂 ウス、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ウサギ、ネコ、イ としては、温血動物(例えば、モルモット、ラット、マ 配列あるいは配列番号:2で表わされるアミノ酸配列 骨髓、副臂、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓な 体、膵臓、脳、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、 番号:1 で表わされるアミノ敵配列を含有する蛋白質及 発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列 ものであれば何なるものであってもよい。すなわち、本 と、同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する 一蛋白質であって、配列番号:1 で表わされるアミノ酸 ど)または細胞などに由来するC蛋白質共役型レセプタ 【0018】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質 び配列番号:2で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋 ミノ酸配列と約90~99.9%の相同性を有するアミ 列と約90~99.9%の相同性を有するアミノ酸配列 白質などの他に、配列番号:1で表わされるアミノ酸配 質の活性を有する蛋白質、配列番号:2で表わされるア を含有し、配列器号:1を含有する蛋白質と実質的に同

> は、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを 質的に同質の活性としては、例えばリガンド結合活性、 質的に同質の活性を有する蛋白質などが挙げられる。実 弱、レセプター蛋白質の分子量などの質的要素は異なっ 示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強 シゲナル情報伝達などが挙げられる。実質的に同質と ノ敵配列を含有し、配列番号:2を含有する蛋白質と実

酸(好ましくは1個以上30個以下、さらに好ましくは 白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号:1で セプター蛋白質などが挙げられる。また、本発明のG蛩 アミノ酸配列を含有するヒト脳由来のG蛋白質共役型レ レセプター蛋白質としては、配列番号:1 で表わされる 表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ 【0019】より具体的には、本発明のC蛋白質共役型 酸(好ましくは1個以上30個以下、さらに好ましくは で衰わされるアミノ酸配列に 1 または 2 個以上のアミノ 下のアミノ酸)が欠失したアミノ酸配列、配列番号:1 1個以上20個以下、より好ましくは1個以上10個以 号:2で表わされるアミノ酸配列を含有するヒト肺由来 のG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番 配列を含有する蛋白質なども挙げられる。また、本発明 以下のアミノ酸)が他のアミノ酸で躍換されたアミノ酸 は1個以上20個以下、より好ましくは1個以上10個 で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミ 下のアミノ酸)が付加したアミノ酸配列、配列番号:1 1個以上20個以下、より好ましくは1.個以上10個以 のG蛋白質共役型レセプター蛋白質などが挙げられる。 ノ酸(好ましくは1個以上30個以下、さらに好ましく は2個以上のアミノ酸(好ましくは1個以上30個以 は、配列番号:2で表わされるアミノ酸配列中の1また また、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質として 下、さらに好ましくは1個以上20個以下、より好まし たは2個以上のアミノ酸(好ましくは1個以上30個以 酸配列、配列番号:2で表わされるアミノ酸配列に1ま くは1個以上10個以下のアミノ酸)が欠失したアミノ または2個以上のアミノ酸(好ましくは1個以上30個 酸配列、配列番号:2で表わされるアミノ酸配列中の1 くは1個以上10個以下のアミノ酸)が付加したアミノ 下、さらに好ましくは1個以上20個以下、より好まし 白質には、N末端のHet が保護基(例えば、ホルミル られる。さらに、本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋 しくは1個以上10個以下のアミノ酸)が他のアミノ酸 以下、さらに好ましくは1個以上20個以下、より好ま 基、アセチル基などのC・・。 アシル基など)で保護され で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質なども挙げ などのC1-6 アシル基など)で保護されているもの、あ 側鎖が適当な保護基(例えば、ホルミル基、アセチル基 1 uがピログルタミン化したもの、分子内のアミノ殻の ているもの、GluのN端側が生体内で切断され、該G

> 質なども含まれる。さらにまた、本発明のG蛋白質共役 るいは糖類が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白 は配列番号:2のアミノ酸配列と同一または実質的に同 型レセプター蛋白質には、本発明の配列番号:1あるい **Λをプライマーあるいはプロープとして用いてクローニ** 号:3あるいは配列番号:4のDNA自体あるいはそ とも理解されよう。さらに具体的には本発明の配列番 レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩でよいこ セプター蛋白質またはその塩あるいは核C蛋白質共役型 ーのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含有する.D N またはその塩あるいは該G蛋白質共役型レセプター蛋白 AによりコードされたG蛋白質共役型レセプター蛋白質 あるいはプローブとして用いてクローニングされたDN 部分配列またはその情報に基づいたDNAをプライマー ングされたDNAによりコードされたG蛋白質共役型レ

質の部分ペプチドまたはその塩であってよいことも理解

ば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるい が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸(例え の塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩 は有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル ホン酸) との塩などが用いられる。本発明のG蛋白質共 [0020] 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質 役型レセプター蛋白質またはその塩は、温血動物の組織 後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。 培養することによっても製造することができる。また、 ター蛋白質をコードする DNAを含有する形質転換体を 造することもできるし、後述するG蛋白質共役型レセプ または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製 ドとしては、例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプ 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプラ 質の疎水性プロット解析において細胞外領域(親水性 4] で示される本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白 一蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位を どが用いられる。具体的には、〔図2〕あるいは〔図 存骸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスル マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ

一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々 のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドの塩 のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数の ヘプチドである。また、疎水性(Hydrophobic)部位を としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好 ドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。本発明 酸)との塩などが用いられる。 ましい。この様な塩としては、例えば無機酸(例えば、 (Hydrophilic・) 部位) であると分析された部分を含む 蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン マレイン機、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、 機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、 塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有

@

ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを紹合させ、生 【0021】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質 の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの 合成法に従って、あるいは本発明のC蛋白質共役型レセ しては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっ ても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分 物が保護基を有する場合は保護基を脱離することによ り目的のペプチドを製造することができる。公知の結合 プター蛋白質 を適当な ペプチダーゼ で切断することによ って製造することができる。さらに、核部分ペプチドを コードする DNA を含有する形質転換体を培設すること によっても製造することができる。ペプチドの合成法と 方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①~⑤に 記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszkyおおよび M.A. Ondetti 、ペプチド・シン セシス (Peptide Synthesis), Interscience Publisher s. New York (1966 年)

②Schroeder およびLucbke、ザ・ペプチド(The Peptid e). Academic Press. N York (1965 年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明および榊原俊平、生化学実験関座 1、タンパ ク質の化学1V、205 、(1977 年)

⑤矢島治明監修、続医奨品の開発第14巻ペプチド合成広

で得られる蛋白質が遊離体である場合は、公知の方法に また、反応後は通常の幇製法、たとえば、塩析・溶媒抽 ラフィー・位気泳動法・再結晶などを組み合わせて本発 明のタンパク質を幇製単機することができる。 上記方法 よって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得 出・孫留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグ られた場合は、公知の方法によって遊牒体に変換するこ

とができる。

をコードする DNAとしては、本発明の配列番号:1の アミノ厳配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列 含有するC蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする **法と略称する。)によって増幅することもできる。より** (0022] 本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質 を含有する G 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードす 塩基配列を含有するものであればいかなるものであって もよい。また、ヒトゲノムDNA、ヒトゲノムDNAラ イブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、ヒト組織 リオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドな どいずれであってもよい。また、組織・細胞よりmRN A 画分を開製したものを用いて直接 Reverse Transcrip ミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を ・細胞由米のcDNAライブラリー、合成DNAのいず れでもよい。 ライブラリーに使用するベクターはバクテ tase Polymerase Chain Reaction (以下, RT- PCR る塩基配列を含有するもの、あるいは配列番号:2のア

ドするDNAとしては、配列番号:4で表わされる塩基 明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDN 2のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸 役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するD NAでよいことも理解されよう。さらに具体的には本発 るDNAとしては、配列番号:3で装わされる塩基配列 記列を有するDNAなどが用いられる。さらには、本発 ドする塩基配列を含有するDNAをプライマーあるいは プローブとして用いてクローニングされかつC蛋白質共 明の配列番号:3あるいは配列番号:4のDNA自体あ プライマーあるいはプローブとして用いてクローニング 塩基配列を有するDNAを含有するDNAであってよい ト脳由来のG 蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードす を有するDNA、配列番号:2のアミノ酸配列を含有す るヒト肺由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコー るいはその部分配列またはその情報に基づいたDNAを されかつC蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする 員体的には、配列番号:1のアミノ做配列を含有すると 配列を含有するC蛋白質共役型レセプター蛋白質をコー Aとしては、本発明の配列番号:1あるいは配列番号: ことも理解されよう。

ular Cloning 2 nd (ed. ; J. Sambrook et al., Cold S 卓額したものとのハイブリダイゼーションによって選別 する。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molec 従って行われる。。また、市販のライブラリーを使用する 場合、添付の使用説明曹に記載の方法に従って行う。こ のPCR増幅方法は、公知のPCR法に従って実施する ことができる。例えば、Saiki R.K. et al. Science,23 数、DNAポリメラーゼなどの酵素、2.-deoxy-7-deaza 【0023】本発明の6蛋白質共役型レセプター蛋白菌 を完全にコードするDNAのクローニングの手段として は、C蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分塩基配列を 有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって 増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNA をヒトC蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部あるいは 全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて pring Harbor Lab. Bress, 1989)に記載の方法などに 9:487-491(1988) に記載の方法に従って実施することが できる。PCR佐の温度、時間、パッファー、サイクル al. Science, 239:487-491 (1988) に記載の方法などに従 って行なう。クローン化されたG蛋白質共役型レセプタ 一蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、ま たは所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加 3. 末端側には朝釈終止コドンとしてのTAA、TGA またRNAを鋳型として用いる場合は、Saiki R.K. et -guanosine triphosphate やInosineの添加などは対象 DNAの種類などに応じて適宜選択することができる。 したりして使用することができる。 核DNAはその5′ 末端側に翻取開始コドンとしてのATGを有し、また

エー (Proc. Natl. Acad. Sci.USA), 60巻, 16 ズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 3 0(1968)), JM103 (ヌクイレック・アシッ ックス (Genetics), 39巻, 440(1954))な ルス・サチルス (Bacillus subtilis) MI 114 (ジ (ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of 09(1981)]. JA221 (ジャーナル・オブ・ モレキュラー・パイオロジー (Journalof Holecular Bi 41巻, 459(1969)], C600[ジェネティ どが用いられる。パチルス瓯菑としては、たとえばパチ ology), 120卷, 517(1978)), HB10 1 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・パイオロジー、 Biochemistry), 95巻, 87(1984)) などが --ン, 24巻, 255(1983)], 207-21 用いられる。

[0026] 辞母としては、たとえばサッカロマイセス H22R', NA87-11A, DKD-5D, 20B - 1 2などが用いられる。昆虫としては、例えばカイコ セレビシエ (Saccaromyces cerevisiae) A H 2 2, A ては、たとえばサル細胞COS-7,Vero . チャイニ 107(1982) などに記収の方法に従って行なわれ の幼虫などが用いられる (荷田ら、ネイチャー (Natur ーズハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイ **慰)、マウスL細胞、マウスミエローマ細胞、ヒトFL** 細胞などが用いられる。エシェリヒア扇菌を形質転換す るには、たとえばプロシージングズ・オブ・ザ・ナショ ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci.USA), 69 る。パチルス函菌を形質転換するには、たとえばモレキ ュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Mole cular & General Genetics), 168巻, 111(1 979) などに記載の方法に従って行われる。 酵母を形 質転換するには、たとえばプロシージングズ・オブ・ザ ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オ A), 75巻, 1929(1978)に配銀の方法に従 e), 315巻, 592(1985)]。動物細胞とし ナル・アカデミー・オブ・サイエンジイズ・オフ・サ・ 巻, 2110(1972)やジーン(Gene), 17巻, ニーズハムスター細胞CHO (dhfr· CHO細 ブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl.Acad. Sci.US って行なわれる。

際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であ て行なわれる。このようにして、G蛋白質共役型レセプ で形質転換された形質転換体が得られる。宿主がエシェ リヒア峄茵、パチルス属菌である形質転換体を培設する 【0027】昆虫細胞を形質転換するには、たとえばパ イオ/テクノロジー (Bio/Technology) .6. 47-55(198 8))などに記載の方法に従って行なわれる。動物細胞 を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virolog り, 52巻, 456(1973)に配収の方法に従っ ター蛋白質をコードする DNA を含有する発現ペクター

のプラスミド (例: pUB110, pTP5, pC19 ター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明の G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAか 片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結 R325, pUC12, pUC13など)、枯草菌由来 を用いて付加することもできる。C蛋白質共役型レセプ 5目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)核DNA断 することにより製造することができる。ベクターとして は、大蹋菌由来のプラスミド (例、pBR322,pB 4など)、酵母由来プラスミド (例、p S H 1 9, p S られるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿 ドンや開訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプター レトロウイルス, ワクシニアウイルス, パキュロウイル スなどの動物ウイルスなどが用いられる。本発明で用い 主に対応して適切なプロモーターであればいかなるもの H15など)、 λファージなどのバクテリオファージ、

rec Aプロモーター、JPLプロモーター、Ipp プロモ 【0024】形質転換する際の宿主がエシェリヒア風菌 ーターなどが、宿主がパチルス属菌である場合は、SP 01プロモーター、SP02プロモーター、pen Pプロ モーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロ A D H プロモーターなどが好ましい。宿主が動物細胞で ある場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウ 一、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイル スプロモーター、SRaプロモーターなどがそれぞれ利 用できる。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的で ある。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列 を、C蛋白質共役型レセプター蛋白質のN端末側に付加 フォスファターゼ・シグナル配列、OmA・シグナル配 する。宿主がエシェリヒア原菌である場合は、アルカリ ラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列な 列などが、宿主がバチルス凤菌である場合は、αーアミ ン・シグナル配列、αーインターフェロン・シゲナル配 どが、宿主が酵母である場合は、メイテイングファクタ **ーα・シグナル配列、インベルターゼ・シグナル配列な** ど、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリ る。このようにして構築されたG蛋白質共役型レセプタ 一蛋白質をコードする D N A を含有するペクターを用い である場合は、trp プロモーター、lac プロモーター、 モーター、PCKプロモーター、CAPプロモーター、 イルスのプロモーター、メタロチオネインプロモータ 列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用でき て、形質転換体を製造する。

8 カデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエス 菌、パチルス属菌、酵母、昆虫、動物細胞などが用いら れる。エシェリヒア屛菌、パチルス属茵の具体例として は、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli)K 1 2・ DH1 (プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・ア 【0025】宿主としては、たとえばエシェリヒア属

またはTAGを有していてもよい。これらの研訳開始コ

9

機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシ 類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カ ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩 は、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、 **茶酒、無機物その他が含有せしめられる。 段素顔として** り、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒 が挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子 ウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなど ゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無 などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望まし

1 of Experiments in Molecular Genetics) , .4 3 1 -ては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 効率よく働かせるために、たとえば3 βーインドリル 972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを 433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1 ンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス(Journa アクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主が 転換体を培養する際、培地としては、たとえばパークホ 気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質 約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通 約3~24時間行い、必要により、通気や脱掉を加える エシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で (ミラー(Miller)、ジャーナル・オブ・エクスペリン 【0028】エシェリヒア屈菌を培養する際の培地とし ールダー (Burkholder) 最小培地 (Bostian..K. L.ら、 こともできる。宿主がパチルス属菌の場合、培養は通常 980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 (B oc. Natl. Acad. Sci.USA), 77巻, 4505(1 プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー ョナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ itter, C. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナシ **風や斑砕を加える。** 0℃~35℃で約24~72時間行い、必要に応じて通 Hは約5~8に調整するのが好ましい。 培養は通常約2 ・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Pr 1巻、5330(1984))が挙げられる。培地のp ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci.USA), 8

が用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整す 化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなど T.C.C.,ネイチャー (Nature):,195,788(1962)) に非動 際、培地としては、Grace's Insect Medium(Grace. ば約5~20%の胎児牛血清を含むMEM培地 (サイエ である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえ い、必要に応じて通気や設拌を加える。 宿主が動物細胞 るのが好ましい。培養は通常約27℃で約3~5日間行 DMEM培地 (ヴィロロジー (Virology) , .8巻, 39 【0029】宿主が昆虫である形質転換体を培養する 6(1959)], RPMI1640焙也[ジャーナル ンス(Seience), 122巻, 501(1952)),

950)] などが用いられる。pHは約6~8であるの ety for the Biological Medicine) , 73%, I(1 ロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・ n) 199巻, 519(1967)], 199培地[プ ${m imes}$ (The Journal of the American Medical Associatio ・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーショ が好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~6 バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Soci 0時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。 [0030] 上記培養物からG蛋白質共役型レセプター

なうことができる。 G蛋白質共役型レセプター蛋白質を 蛋白質を分離精製するには、例えば下記の方法により行 トリトンX-100(登録商標。以下、TMと省略する の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、 白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液 ち、遠心分離やろ過により6蛋白質共役型レセプター強 凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したの な級衝液に懸濁し、超音波、リソチームおよび/または 後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当 培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養 ことがある。)などの界面活性剤が含まれていてもよ れるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の精製は、自体公 体あるいは細胞と上滑とを分離し、上滑を集める。この される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌 い。培養液中にG蛋白質共役型レセプター蛋白質が分泌 媒沈顯法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ 知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことがで ようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含ま 法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利 過法、ゲルろ過法、およびSDSーポリアクリルアミド きる。これらの公知の分離、幇製法としては、塩析や溶 決動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられ ラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、 等電点電気 特異的新和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグ 用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの ゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方

あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することが て生成するG蛋白質共役型レセプター蛋白質の活性は標 る。蛋白物師辞栞としては、例えば、トリプシン、キモ 加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもでき な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を 共役型レセプター蛋白質を、精製前または精製後に適当 することができる。なお、組換え体が産生するG蛋白質 はそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変数 でき、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるい 一蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法 【0031】かくして得られるC蛋白質共役型レセプタ ンキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。 かくし トリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテイ

> ①本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリ **諡したリガンドとの結合実験および符異抗体を用いたエ** 物のスクリーニング、③構造的に類似じたリガンド・レ いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合 え型レセプター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用 ガンドの決定方法、②抗体および抗血清の入手、③粗換 するDNAおよびG蛋白質共役型レセプター蛋白質は る。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコード ンザイムイムノアッセイなどにより測定することができ の作成、②遺伝子治療等に用いることができる。特に、 施、⑥遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマー セプターとの比較にもとついたドラッグデザインの実 などの温血動物に特異的なG蛋白質共役型レセプターア 現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、ヒト 本発明の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発 病の予防・治療剤などとして使用することができる。本 ゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングするこ 白質」あるいは「C蛋白質共役型レセプター蛋白質また する。本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質をコー Aおよび抗体の用途について、以下により具体的に説明 ド、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDN 発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、部分ペプチ とができ、核アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾 型G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞また はその部分ペプチド」と略称する場合もある)、組換え レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩 ドするDNA、核DNAにコードされるG蛋白質共役型 はその細胞膜画分などの有用性について、さらにより群 (以下、塩を含めて単に「G蛋白質共役型レセプター蛋

> > ることができる。特に生物活性あるいは生物応答反応で

検知可能なものを好ましく測定できる。

蛋白質に対するリガンドの決定方法本発明のG蛋白質共 は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは 分ペプチドもしくはその塩は、本発明のC蛋白質共役型 役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部 知のリガンド(例えば、アンギオテンシン、モンペシ するための試薬として有用である。すなわち、本発明 ルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチド ン、ボンベシン、カナビノイド、コレシストキニン、グ リガンドの決定方法を提供する。試験試料としては、公 する本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する 試験化合物などの試験試料とを接触させることを特徴と その塩または本発明の部分ペプチドもしくはその塩と、 [0032] (1) 本発明のG蛋白質共役型レセプター ミン、モチリン、アミリン、ブラジキニン。CGR-P ン、VIP(パソアカティブ インテスティナル アン **ンセプター蛋白質に対するリガンドを探索しまたは決定** レノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチ ド・リレイテッドペプチド)、ソマトスタチン、ドーバ Y、オピオイド、プリン、パンプレッシン、オキシトシ (カルシトニンジーンリレーティッドペプチド) 、アド

> ン、プロスタグランジン、トロンボキサン、アデノシ MIP-Iβ、RANTESなど)、エンドセリン、エ 8, GROα, GROβ, GROγ, NAP-2, EN ン、アドレナリン、αおよびβ-chemokine (IL-員などの化合物などの他に、例えば温血動物(例えば、 れた誘導体、それらの類縁体、それらのファミリー構 ファミリー構成員など)あるいはそれらの新規な修飾 それらの修飾された誘導体、それらの類縁体、それらの RH、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、 ンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、T 1, HC14, MCP-3, 1-309, MIP1a, A-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-白質共役型レセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性な えば、核組織抽出物、細胞培養上清などを本発明のG蛋 ど)の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例 マウス、ラット、ブダ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒトな どを測定しながら分画し、最終的に単一のリガンドを得

は、本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは os活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制 生、細胞脱電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-P生成、細胞内 c G M P 生成、イノシャールリン酸産 アセチルコリン溢輯、細胞内Cas 遊籍、細胞内 CAM に結合して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊戲、 用いることによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質 構築し、核発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を 用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を その塩、または本発明の部分ペプチドもしくはその塩を [0033] 具体的には、本発明のリガンド決定方法 産物など)またはその化合物などの塩を決定する方法 する活性)を有する化合物などの試料(例えば、ペプチ ある。本発明のリガンド決定方法においては、本発明の ド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵 刺激活性などを測定することを特徴とする。 ペプチドに対する試験化合物などの試料の結合量、細胞 例えば核G蛋白質共役型レセプター蛋白質または核部分 G蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明の部分ペ プチドと試験化合物などの試料とを接触させた場合の、

①標識した試験化合物などを、本発明のC蛋白質共役型 プチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識 レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明の部分へ ることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に 核部分ペプチドもしくはその塩に対する結合鼠を測定す した試験化合物などの該蛋白質もしくはその点、または 対するリガンドの決定方法、 【0034】より具体的には、本発明は、

に接触させた場合における、標識した試験化合物などの レセプター蛋白質を含有する細胞または核細胞の膜画分 ②標識した試験化合物などを、本発明のC蛋白質共役型 3

数細胞または核脱画分に対する結合蛍を測定することを 特徴とするC 蛋白質其役型レセプター蛋白質に対するリ

検体を培設することによって細胞膜上に発現した G 蛋白 f白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定 ノセプター蛋白質をコードする DNA を名有する形質院 蛋白質に対する結合血を測定しすることを特徴とするG ③は粒したば酸化合物などを、本発明のG蛋白質共役型 原職した試験化合物などの核 5 蛋白質共役型レセプター **質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、**

役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合 ど)を測定することを特徴とするC蛋白質共役型レセプ 質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを [0035] ④試験化合物などを、本発明のC蛋白質共 における、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細 ン資格、哲酌内Cas 沿路、細胞内cAMP生成、細胞 内c C M P 生成、 イノツトールリン敬雄生、 超超版铅位 一蛋白質をコードする DNAを含有する形質転換体を培 遊することによって細胞版上に発現したG 蛋白質共役型 を特徴とするC蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する **砲刺激活性(例えば、アラキドン鉱遊離、アセチルコリ** ③試験化合物などを、本発明のG蛋白質共役型レセプタ レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質 ば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊職、笛覧内C イノシトールリン敬産生、細胞脱蹌位変動、細胞内蛋白 促進する活性または抑制する活性など)を測定すること 変動、細胞内蛋白質のリン酸化、cーfosの活性化、 as·遊路、趙昭内c A M P 生成、趙昭内 c G M P 生成、 p Hの低下などを促進する活性または抑制する活性な **共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例え** ター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および

જ パキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclea 発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適してい は役型レセプター蛋白質または本発明のG 蛋白質共役型 【0036】本発明のリガンド決定方法の具体的な説明 を以下にする。まず、リガンド決定方法に用いるC蛋白 世共役型レセプター蛋白質としては、本発明のG蛋白質 レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれ ば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量 前述の方法が用いられるが、眩蛋白質をコードするDN A を哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行う ことができる。目的部分をコードするDNA断片には相 備DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるも もよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする 発現させるためには、核DNA断片を厚虫を宿主とする のではない。例えば、遠伝子断片や合成DNAを用いて DNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく る。 C 蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、

ーター、SV40 田米のプロホーター、フトロウイルス のプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒト ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプ ロモーター、SRaプロモーターなどの下流に組み込む のが好ましい。発現したレセプターの紐と質の検査はそ r polyhedrosis virus:NPV)のポリヘドリンプロモ れ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献

(Nambi . P . ち、ず・ジャーナル・オブ・バイオロジ 19559 頁,1992 年] に記収の方法に従って行うことがで カル・ケミストリー(J. Biol. Chem.),267巻,19555~

おいて、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白 **質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するも** のとしては、それ自体公知の方法に従って幇毀したG蛋 白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レ セプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、核蛋 白質を含有する細胞を用いてもよく、また眩蛋白質を含 有する細胞の散画分を用いてもよい。本発明のリガンド 決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を それ自体公知の方法又はそれと類似の方法に従って行う 菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられ ジナイザーで笛覧を押し資す方法、ワーリングブレンダ 上清をさらに高速(15000грm~30000гр 【0037】したがって、本発明のリガンド決定方法に 含有する細胞を用いる場合、核細胞をグルタルアルデヒ ド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は ことができる。 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有 する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を 発現した宿主細胞をいうが、数宿主細胞としては、大腸 る。膜画分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知 の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをい う。細胞の破砕方法としては、Potter−Elvehjem型ホモ ーやポリトロン (Kinematica社製) による破砕、超音波 による破砕、ソレンチプレスなどで加圧しながの細胞を 細いノズルから慣出させることによる破砕などが挙げら れる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遺 い分群法などの遠心力による分画法が主として用いられ る。例えば、細胞破砕液を低速 (500 r pm~300 セプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの m)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈澱を順画 分とする。核膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レ 0 r b m) で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、

ガンドの決定方法を提供する。

(比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構 の位は、1組胞当たり103~108分子であるのが好 ましく、105~107分子であるのが好適である。な **お、発現団が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性** 類が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料 【0038】 絃G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有 する細胞や殿画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質 版成分が多く含まれる。

を測定できるようになる。C蛋白質共役型レセプター蛋

白質に結合するリガンドを決定する前記の①~⑤の方法 役型しセプター画分としては、天然型のC蛋白質共役型 レセプター画分か、またはそれと同等の活性を有する組 13 1]、 ['* C]、 ['* S] などで模類したアンギオ **ルンシン、 ホンスシン、 おンスシン、 カナアノイド、 コ** ソ、ニューロペプチドヤ、オピオイド、プリン、パソプ マトスタチン、ドーパミン、モチリン、アミリン、ブラ を実施するためには、適当なC蛋白質共役型レセプター <u>画分と、標柢した試験化合物が必要である。G蛋白質丼</u> ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性など レッシン、オキシトシン、VIP(パンアクティブイン テスティナル アンド リレイテッド ペプチド) 、ソ ジキニン、CGRP(カルシトニンジーンリレーティッ パンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボキ サン、アデノシン、アドレナリン、a および β - chemok ine (11-8, GROa, GROß, GROy, NA MIP1a, MIP-1β, RANTES&U), エン ドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロ ドペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、 2, MCP-1, HC14, MCP-3, 1-309, **換え型C蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。** を示す。概倣した試験化合物としては、 [1 H] 、 (レシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニ ・ド、ガラニン、それらの類諱誘導体などが好適である。 P-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-テンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイ

白質に結合するリガンドの決定方法を行うには、まずG 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細 題の関画分を、決定方法に適したパッファーに懸濁する は、pH4~10 (望ましくはpH6~8) のリン酸パ ッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼ に、一定団 (5000cpm~50000cpm)の ッファー、トリスー塩酸パッファーなどのリガンドとレ やウシ血消アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をハ によるリセプターやリガンドの分解を抑える目的でPM (b H)、(Itz I)、(It C)、(tz S) などで模数 【0039】具体的には、C蛋白質共役型レセプター番 セプターとの結合を阻害しないパッファーであればいず 社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤 もできる。0.01m1~10m1の粒フセプター溶液 した試験化合物などを共存させる。非特異的結合盟(N SF、ロイベブチン、E-64(イブチド母約所製)、 SB)を知るために大過剰の未様類の試験化合物などを ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加すること ことによりレセプター協品を餌製する。バッファーに で、望ましくは4でから37でで20分から24時間、 れでもよい。また、非特異的結合を低級させる目的で、 加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50 CHAPS、Tween-80m (在王ーアトラス

望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス揺組

特別平9-121865

3

戯紙等で越過し、適盟の同パッファーで洗浄した後、ガ ント(B-NSB)が0cpmを超える試験化合物など ラス樹群巡抵に歿存する放射活性を液体シンチレーショ ンカウンターあるいは γ ーカウンターで計削する。 全結 合位(B)から非特異的結合位(N S B)を引いたカウ を本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリ ガンドとして選択することができる。

c GMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞脳配位数 動、細胞内蛋白質のリン酸化、cーfosの活性化、p る。細胞刺激活性の指環とする物質(例えば、アラキド 印徴活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン 趙鎬、趙昭内Cas 遊霧、趙昭内cAMP生成、趙昭内 インキュベートした後、曲節を抽出あるいは上資液を回 【0040】 G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合す るリガンドを決定する前記の④~⑤の方法を奥施するた めには、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞 を公知の方法または市阪の測定用キットを用いて測定す ることができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レ 箏に培扱する。リガンド決定を行なうにあたっては前も って新鮮な培地あるいは細胞に雄性を示さない適当なバ ッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間 収して、生成した確物をそれぞれの方法に従って定量す ン餃など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって **效定困避な場合は、眩分解酵素に対する阻害剤を添加し** てアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制 などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基 礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作 セプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など) 用として検出することができる。

【0041】本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質 に結合するリガンド決定用キットは、本発明のC蛋白質 共役型レセプター蛋白質またはその塩、本発明のC 蛋白 る細胞、あるいは本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋 発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが 塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有す 質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその 白質を合有する細胞の膜画分を含有するものである。

1. リガンド決定用試験

D別定用根循液および洗浄用観衝液

0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製)を加え たもの。孔径0. 45μmのフィルターで超過域面し、 lanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、 4 ℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。 ②C蛋白質共役型レセプター蛋白質域品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO組 節を、12穴プレートに5×10⁵ 個/穴で様代し、3 7℃、5%CO2 95%a1 rで2日間培養したもの。

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存 で標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの 市阪の[³ Н]、 [¹8]]、 [¹ С]、 [* S] など 浴性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミ し、用時に測定用緩衝液にて1µMに希釈する。水に繋 ド、DMSO、メタノール等に溶解する。

標識化合物を同じものを100~1000倍濃で濃度に ④非磷酸試験化合物

[0042] 2. 測定法

型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用 ①12六組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役 超衝液 1 m l で 2 回洗浄した後、4 9 0 μ l の測定用級 衝液を各穴に加える。

せる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物 ②標識試験化合物を5μ1加え、室温にて1時間反応さ

る。細胞に結合した標識試験化合物をO.2N NaO ②反応液を除去し、1m1の洗浄用観衝液で3回洗浄す H-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーター を5μー加えておく。

④液なシンチレーションカウンター(ベックトン社製) Λ (和光純薬製) と混合する。 を用いて放射活性を測定する。

とができるリガンドとしては、例えば脳、肺、下垂体、 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するこ 的にはアンギオテンツン、モンベツン、ボンベツン、カ 膵臓などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体 リン、パソプレッシン、オキシトシン、VIP(パソア ナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニ クティブインテスティナル アンド リレイテッド ペ ン、メラトニン、ニューロペプチドソ、オピオイド・プ LUβ—chemokine (IL−8, GROα, GROβ, コトリエン、パンクレアスタチン、プロスタグランジ リレーティッドペプチド)、アドレノメジュリン、ロイ ミリン、ブラジキニン、CGRP(カルシトニンジーン ブチド)、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリン、ア GROY, NAP-2, ENA-78, PF4, IPI ン、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、aお

の類縁誘導体、それらのファミリー棉成員などが挙げら リベプタイド、ガラニン、それらの修飾誘導体、それら など)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミ 0, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, ン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポ 1-309, MIPIα, MIP-1β, RANTES

[0043] (2) 本発明のG蛋白質共役型レセプター

セプター蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、核 蛋白質欠乏症の予防・治療剤 上記(1)の方法において、本発明のG蛋白質共役型レ

型レセプター蛋白質をコードするDNAをG蛋白質共役 型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤として使用す リガンドが有する作用に応じて、本発明のG蛋白質共役 白質共役型レセプター蛋白質が減少しているためにリガ ることができる。例えば、生体内において本発明のC質 ンドの生理作用が期待できない患者がいる場合に、

のC蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA いは肺細胞におけるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の 患者に移植することなどによって、眩患者の脳細胞ある を挿入し発現させた後に、核脳細胞あるいは肺細胞を核 て、あるいは(ロ)脳細胞あるいは肺細胞などに本発明 ドするDNAを核患者に投与し発現させることによっ 明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治 **揖を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させること** いはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクタ 療剤などとして用いることができる。本発明のDNAを ター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性な本発 ができる。したがって、本発明のC蛋白質共役型レセプ (イ) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコー 上記治療剤として使用する場合は、核DNAを単独ある

実施することができる。該剤は様々な医薬組成物又は医 などの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って **剤、臓形剤、アジュバント、希釈剤、人にクラ、防腐** を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカ 薬調製物にして使用できる。例えば、必要に応じて糖衣 ー、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクター **剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤** ば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味 獨液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例え 以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸 製造することができる。これら製剤における有効成分量 実施に要求される単位用量形態で混和することによって プセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするも

理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例 がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに ェリーのような香味剤などが用いられる。 調剤単位形態 ンのような甘味剤、ベパーミント、アカモノ油またはチ ネシウムのような酒滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリ ン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグ セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチ チ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性 きる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスター 【0044】錠剤、カプセル剤などに混和することがで って処方することができる。注射用の水性液としては生 物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油など 油脂のような液状担体を含有することができる。注射の を溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたが ための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性

> コール (たとえばプロピレングリコール、ポリエチレン えばアルコール (たとえばエタノールなど) 、ポリアル リウムなど)などがあげられ、適当な溶解補助剤、たと リソルベート80 (TM)、HCO=50など) などと 併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などが あげられ、洛解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジ ゲリコールなど)、非イオン性界面活性剤(たとえばホ

ルなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整され えば、ヒト血液アルプミン、ポリエチレングリコールな ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、 安定剤(例 酢酸ナトリウム緩衝液など)、無痛化剤(例えば、塩化 することができる。核DNAの投与量は、症状などによ ば温血哺乳動物(例えば、ラッド、ウサギ、ヒツジ、ブ うにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例え た注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このよ ど)、保存剤(例えば、ペンジルアルコール、フェノー 00mg、好ましくは約1.0~50mg、より好まし kgとして) においては、一日につき約0.1mg~1 り差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60 タ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど)に対して投与 mg程度、より好ましくは約0...1~10mg程度を静 約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20 与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形で 合は、その1回投与畳は投与対象、対象臓器、症状、投 くは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場 合も、60kg当たりに換算した最を投与することがで 脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場 は通常成人(60kgとして)においては、一日につき

蛋白質に対するリガンドの定量法 【0046】(3) 本発明のG蛋白質共役型レセプター

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその 白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、またはC 用いることができる。すなわち、被検体を本発明のC質 の定置法は、例えば競合法と組み合わせることによって リガンド濃度を感度良く定量することができる。本発明 ンドに対して結合性を有しているので、生体内における 塩、または本発明の部分ペプチドまたはその塩は、リガ 度を測定することができる。具体的には、例えば、以下 その塩と接触させることによって被検体中のリガンド濃 蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしへは 法に従って用いることができる。 の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方

①人工資糧「ラジオイムノアッセイ」(篩談社、昭和4

②入五寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和

えば、Dーソルピトール、Dーマンニトール、塩化ナト

【0045】また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、 ルアルコールなどと併用してもよい。 蛋白質とリガンドの結合性を変化させる化合物のスケリ ることによって、リガンドとG蛋白質共役型レセプター るか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築 塩、または本発明の部分ペプチドもしくはその塩を用い 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその 蛋白質との結合性を変化させる化合物(例えば、リガン し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用い 【0047】(4)本発明のG蛋白質共役型レセプター ドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害

え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、 核発現系を用 蛋白質との結合を促進する化合物など)またはその塩を る化合物あるいはリガンドとG蛋白質共役型レセプタ いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、 の部分ペプチドもしくはその塩を用いるか、または組換 共役型レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明 物組織抽出液など)またはその塩を、本発明のG蛋白質 合成化合物、茺萨生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動 物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物 蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合 スクリーニングすることができる。特にはリガンドとG は、G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性 などを促進する活性または抑制する活性など)を有する 内蛋白質のリン酸化、cーfosの活性化、pHの低下 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜質位数勢、細胞 胞内Ca²:遊縣、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP スクリーニングすることができる。このような化合物に わゆる本発明の「G蛋白質共役型レセプターアンタゴニ アゴニスト」)と該細胞刺激活性を有しない化合物(い 化合物(いわゆる本発明の「G蛋白質共役型レセプター スト」)などが含まれる。 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細

のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合性を変化さ 合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと本発明 はその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場 白質もしくはその塩または本発明の部分ペプチドもしく せた場合と (11) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋 明の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドを接触さ 白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本 ター蛋白質との結合を促進する化合物またはその塩)の の塩あるいはリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプ 型レセプター蛋白質との結合を阻密する化合物またはそ せる化合物(例えば、リガンドと本発明のG蛋白質共役 [0048] すなわち、本発明は、(1) 本発明のG を接触させた場合と(ii)本発明のC蛋白質共役型レセ スクリーニング方法を提供する。 本発明のスクリーニン および試験化合物を接触させた場合における、例えば該 プター蛋白質または本発明の部分ペプチドに、リガンド プター蛋白質または本発明の部分ペプチドに、リガンド グ方法においては、(F)本発明のC 蛋白質共役型レセ

(16)

特開平9-121865

(18)

G蛋白質Jt役型レセプター蛋白質または核部分ペプチド て、比較することを特徴とする。特に生物活性あるいは 【0049】以下、リガンドと本発明のG蛋白質共役型 レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその 塩のスクリーニング方法を例に挙げてより具体的に説明 するが、それに限定されないことは理解されるべきであ に対するリガンドの結合は、細胞対徴活性などを測定し 生物応答反応で検知可能なものを好ましく測定できる。 る。より具体的には、本発明は、

蹴したリガンドの核蛋白質もしくはその塩、または核部 役型レセプター蛋白質との結合を阻容する化合物または 発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩 ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、概 **校することを特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共** |経路したリガンドを、本発明のC 蛋白質共役型レセプ |一蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役 型フセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩に接触 させた場合と、様雄したリガンドおよび試験化合物を本 または本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分 分ペプチドもしくはその塩に対する結合口を測定し、比 その猫のスクリーニング方法、

ター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触 発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞 G蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化 ◎模類したリガンドを、本発明のC蛋白質共役型レセプ させた場合と、標鉱したリガンドおよび試験化合物を本 または眩細胞の関画分に接触させた場合における、標識 したリガンドの眩細胞または眩厥画分に対する結合昼を **訓定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明の** 合物またはその塩のスクリーニング方法、

殺することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役 る結合鈕を測定し、比較することを特徴とするリガンド ◎疑問したリガンドを、本発明のG蛋白質共役型したプ 培徴することによって細胞膜上に発現したC蛋白質共役 と本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を ター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を **|レセプター蛋白質に扱触させた場合と、概蹴したリガ** ンドおよび試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプ ター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を 型レセプター蛋白質に接触させた場合における、機識し たリガンドの核 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質に対す **和客する化合物またはその塩のスクリーニング方法、**

における、C 蛋白質共役型レセプターを介した細胞刺激 【0050】 ③本発明のC 蛋白質共役型レセプター蛋白 **資を活性化する化合物(例えば、本発明のG蛋白質共役** 型レセプター蛋白質に対するリガンドなど)を本発明の G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触 させた場合と、本発明のC蛋白質共役型レセプターを活 性化する化合物および試験化合物を本発明のG蛋白質共 役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合

ーニング方法に用いる G 蛋白質共役型レセプター蛋白質

のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する を測定し、比較することを特徴とするリガンドと本発明 攝、趙陀内Ca→道權、趙陀内cAMP生成、趙陀内c 舌性(例えば、アラキドン歓遊艦、アセチルコリン遊 CMP生成、インツトートリン数磁性、色配数色位数 Hの低下などを促進する活性または抑制する活性など 哲問内蛋白質のリン数化、c-fosの活性化、 化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコ ③本発明の G 蛋白質共役型レセプターを活性化する化合 物 (例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質 に対するリガンドなど)を本発明のG蛋白質共役型レセ プター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体 を培扱することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共 役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、本発明のG **蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験 −ドするDNAを含有する形質転換体を培扱することに** よって細胞膜上に発現した G 蛋白質共役型レセプター蛋 白質に接触させた場合における、C蛋白質共役型レセブ ターを介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン敏遊

A M b 生成、趙煦内 c G M b 生成、イノシャールリン酸 るリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質 森、アセチルコリン協築、趙戬内Cas 遊籍、趙翫内c f osの活性化、pHの低下などを促進する活性または 印制する活性など)を捌定し、比較することを特徴とす との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニン 産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c グ方法を提供する。

得て(一次スクリーニング)、その後に眩喉補化合物が ストまたはアンタゴニストを実際にスクリーニングする ことは困難であった。しかしながら、本発明のヒト由来 て、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドと G 蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物を **効率良くスクリーニングすることができる。さらに、ス** アゴニストか
G 蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト かを評価することができる。本発明のスクリーニング方 法の具体的な説明を以下にする。まず、本発明のスクリ ずラットなどのC蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む 細胞、粗微またはその細胞膜画分を用いて候補化合物を リーニング)が必要であった。細胞、組織または細胞膜 **画分をそのまま用いれば他のレセプター蛋白質も混在す** るために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニ 【0051】本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質 が得られる以前は、C蛋白質共役型レセプターアゴニス トまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、ま 実際にヒトの 6 蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガン ドとの結合を阻害するか否かを確認する試験(二次スク クリーニングされた化合物がG 蛋白質共役型レセプター G蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いることによう

たはC蛋白質共役型フセプター蛋白質の部分ペプチドを 合有するものであれば何れのものであってもよいが、温 ングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大嶝 血動物の臓器の膜面分が好適である。しかし、特にヒト 由来の陰器は入手が極めて困難なことから、スクリーニ 発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適してい としては、本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質ま

るには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコード より行うことができる。目的部分をコードするDNA断 ドするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効 ンプロモーター、S V 4 0 由来のプロモーター、レトロ ば、文献(Nambi . P . ら、ザ・ジャーナル・オブ・バ 片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約 されるものではない。例えば遺伝子断片や合成DNAを **率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主** 一、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウ 組み込むのが好ましい。発現したレセプターの位と質の 【0052】6蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造す するDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することに 用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコー (nuclear polyhedrosis virus: NPV) のポリヘドリ 巻,19555~19559 頁,1992 年) に記載の方法に従って行 方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質または C 蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有 たG蛋白質共役型レセプター蛋白質または核G蛋白質共 し、眩蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また眩蛋 ウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモータ イルスプロモーター、SRaプロモーターなどの下流に うことができる。したがって、本発明のスクリーニング するものとしては、それ自体公知の方法に従って幇関し とするパキュロウイルスに困する核多角体病ウイルス イオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) ,267 役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよい 検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例え 白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

トロン (Kinematica社製) による破砕、超音波による破 【0053】本発明のスクリーニング方法において、G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる 場合、眩細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで 固定化してもよい。 固定化方法はそれ自体公知の方法又 しては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿 の破砕方法としては、Potter—ElvehJen型ホモジナイザ はそれと実質的に類似の改変法に従って行うことができ る。C蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞と **猫、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。 殷**画 分としては、細胞を破砕した後、それ自体公知の方法で 得られる類胞散が多く含まれる画分のことをいう。細胞 **一で笛覧を辞し弦す方法、ワーリングブフンダーをポリ** 主細胞をいうが、核宿主細胞としては、大脳菌、枯草

段、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を勧いノズ ルから頃出させることによる彼母などが挙げられる。却 的数の分面には、分画遠心分臨法や密度勾配遠心分韓法 m) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上浴を さらに複磁(15000rpm~30000rpm)で 通常30分~2時間遠心し、得られる沈穀を駁画分とす る。核膜画分中には、発現したC蛋白質共役型レセプタ 一蛋白質と細胞由来のリン脂質や脱蛋白質などの脱成分 が多く含まれる。核C蛋白質共役型レセプター蛋白質を 含有する細胞や脳画分中のC蛋白質共役型レセプター斑 白質の量は、1細胞当たり101~104分子であるの る。なお、発現蛩が多いほど殷函分当たりのリガンド結 合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング 系の構築が可能になるばかりでなく、周一ロットで大量 などの遠心力による分回法が主として用いられる。例え ば、細胞破砕液を低速(500грm~3000гр が好ましく、105~107分子であるのが好適であ の試料を測定できるようになる。

ターとの結合を阻留する化合物をスクリーニングする前 記の①~②を実施するためには、適当なC蛋白質共役型 フセプター画分と、紋類したリガンドが必要である。 C **蛩白쮳共役型しセプター画分としては、天然型のC蛋白** 質共役型レセプター画分か、またはそれと同等の活性を 育する組換え型C蛋白質共役型レセプター画分などが望 ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合 **活性などを示す。概題したリガンドとしては、概職した** 行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有 たパッファーに懸濁することによりレセプター概品を餌 【0054】リガンドと本発明のC蛋白質共役型レセブ S〕などで模糊されたリガンドなどを利用することがで きる。具体的には、リガンドとG蛋白質共役型レセプタ ●蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを する細胞または細胞の駁画分を、スクリーニングに適し **数する。パッファーには、pH4~10(窒ましくはp** パッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結 る。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンド ─ゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~10 500000cpm) の益額したリガンドを浴加し、同 非特異的結合型 (NSB)を知るために大過剰の末標闆 リガンド、爆燃したリガンドアナログ化合物などが用い 5れる。例えば [1 H] 、 [12 1] 、 [4 C] 、 [3 **一などのリガンドXとレセプターとの結合を阻害しない** 合を低減させる目的で、CHAPS、Tween—80 の分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-6 H 6~8) のリン酸パッファー、トリスー塩酸パッファ m (花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレー 4(ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテア n 1 の数フセプター溶液に、一定面(2000 c o m~ 特に10・4 M~10·10 Mの試験化合物を共存させる。 トなどの界面活性剤をパッファーに加えることもでき 8

でから50で、翌ましくは4でから37でで20分から のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は0 特異的結合質(NSB)を引いたカウント(Bo -NS る。拮抗する物質がない場合のカウント(Bo)から非 チレーションカウンターまたは y ーカウンターで計測す した後、ガラス繊維磁紙に残存する放射活性を液体シン ガラス繊維総紅等で濾過し、適鼠の同パッファーで洗剤 2 4時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後 ある候補物質として選択することができる。 が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力の B) を100%とした時、特異的結合量 (B-NSB)

る前記の①~⑤の方法を実施するためには、G蛋白質共 ター蛋白質との結合を阻害する化合物スクリーニングす 讎、細胞内 c A M P 生成、細胞内 c G M P 生成、イノシ 役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、 的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有 販の測定用キットを用いて測定することができる。 具体 る活性または抑制する活性など)を公知の方法または市 アラキドン欧遊籍、アセチルコリン遊舞、細胞内Ca遊 【0055】リガンドと本発明のC蛋白質共役型レセフ 後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産 いは細胞に母性を示さない適当なパッファーに交換し、 する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。 スクリ ン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進す トールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリ いては、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生資を増 物をそれぞれの方法に従って定員する。細胞刺激活性の 試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした 指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を有する細胞 型レセプター蛋白質を発現した細胞としては、天然型の 質を発現した細胞が必要である。本発明のG蛋白質共役 グを行なうには、適当なG蛋白質共役型レセプター蛋白 ることができる。細胞刺激活住を測定してスクリーニン 大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出す なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性につ が、細胞が含有する分解酵素によって、検定困難な場合 が望ましい。試験化合物としては、例えばペプチド、タ 株、前述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質発 ーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地ある 血液、体液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合 物、細胞抽出液、植物抽出液、動物粗糙抽出液、血剂、 現細胞株(例えば、CHO細胞、COS細胞など)など 物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。 ンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産 【0056】リガンドと本発明のC蛋白質共役型レセプ 、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行

> G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、ある セプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、本発明の ーニング用キットの例としては、次のものが挙げられ る細胞の膜画分を含有するものである。本発明のスクリ いは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有す

1. スクリーニング用試薬

①測定用援衝液および洗浄用緩衝液

たもの。孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、 0.05%のウシ血清アルプミン(シグマ社製)を加え Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、 4 ℃で保存するか、あるいは用時間製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター標品 的を、12穴プレートに5×10°個/穴で離代し、3 G 蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細 7°C、5%CO2、95%alrで2日間培養したも

③葆撰ごガンド

市版の [º H]、 [ºº I]、 [º C]、 [ºº S] など で模擬したリガンド

④リガンド標準液 水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存 し、用時に測定用級衝液にて1 μMに希釈する。

を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で リガンドを0.1%ウシ血液アルブミン (シグァ社製) [0057] 2. 例定法

級衝液 1 m 1 で2回洗浄した後、490 μ 1の測定用級 ①12穴組織培養用プレートにて培養したの蛋白質共後 型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用 ②10·3~10·10 Mの試験化合物溶液を5μ l 加えた 衝液を各穴に加える。

②反応液を除去し、1m1の洗浄用観衝液で3回洗浄す せる。非特異的結合盛を知るためには試験化合物のかわ 後、標識リガンドを5μー加え、室温にて1時間反応さ -1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA る。細胞に結合した核擬リガンドをO.2N NaOH りに10ºMのリガンドを5μ1加えておく。 (和光純薬製)と混合する。

④液体シンチレーションカウンター (ベックトン社製) を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB)を次の式 (数1) で求める。

【数1】PMB= ((B-NSB))/(Bo-NS

B)) ×100

PMB: Percent Waximum Binding :検体を加えた時の値

NSB:Non-specific Binding (非特異的結合風)

【0059】本発明のスクリーニング方法またはスクリ Bo :最大結合盈

クリーニング用キットは、本発明のC蛋白質共役型レセ ター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のス

プター蛋白質またはその塩、本発明のG蛋白質共役型レ

は、リガンドと本発明のC蛋白質共役型レセプターとの 結合性を変化させる化合物またはその塩である。特に好 の塩(いわゆる「G蛋白質共役型レセプターアゴニス セプターを介して細胞刺激活性を有する化合物またはそ を阻害する化合物であり、具体的にはG蛋白質共役型レ ましくは本発明のスクリーニング方法またはスクリーニ に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有し ゴニストは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質 化合物であってもよい。 核6蛋白質共役型レセプターア これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の ド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ る。核化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチ る「G蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト」)であ ト」)、あるいは該刺激活性を有しない化合物(いわゆ リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプターとの結合 ング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、 ーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩 薬組成物として有用である。逆に、G蛋白質共役型レセ ているので、核リガンド活性に応じて安全で低毒性な医 することができるので、該リガンド活性を抑制する安全 プター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性を抑制 部または一部を有しているので、該生理活性に応じて安 がソマトスタチンである場合、ソマトスタチンレセプタ 明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド で低毒性な医薬組成物として有用である。例えば、本発 プターアンタゴニストは、本発明のC蛋白質共役型レセ 長ホルモン、下垂体ホルモン(例えば、ガストリン、イ 全で低毒性な医薬組成物として有用である。例えば、成 ーアゴニストは、ソマトスタチンが有する生理活性の全 **徴傷などの予防または(および)治療剤などとして有用** 有用であり、 さらには内分泌疾患、内分泌腫瘍、ホルモ ば、ガストリン、インシュリンなど)等のホルモンの産 成長ホルモン、下垂体ホルモン(例えば、甲状腺刺激ホ 安全で低毒性な医薬組成物として有用である。例えば、 部を抑制することができるので、核生理活性を抑制する である。一方、ソマトスタチンレセプターアンタゴニス ンシュリンなど)等のホルモンの産生抑制剤などとして 全、糖尿病などの予防または(および)治療剤、あるい 者削傷、骨粗鬆症、不眠症、肝機能疾患、乳汁分泌不 生抑制剤などとして有用であり、さらには小人症、高年 ルモン、プロラクチンなど)、消化管ホルモン(例え トは、ソマトスタチンが有する生理活性の全部または一 ン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痴呆症、糖尿病、胃 膜、肝臓などの蔵器の機能調節剤)などとして有用であ は消化管緒蔵器の機能調節剤(例えば、胃、小腸、膵

を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従 ーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩 って実施することができる。該組成物は様々な医薬製剤 【0060】本発明のスクリーニング方注またはスクリ

ことができる。これら製剤における有効成分量は指示 はそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、ま 又は医薬調製物にして使用できる。例えば、必要に応じ れる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定 たは感濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用でき クロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしく て糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイ 求される単位用量形態で混和することによって製造する 剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要 る。例えば、核化合物またはその塩を生理学的に認めら ある場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような な香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルで 味剤、ベバーミント、アカモノ油またはチェリーのよう うな潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘 酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのよ のような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン 剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガ る。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加 れた範囲の適当な容量が得られるようにするものであ は懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方す ント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロース 油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解また 成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻 液状担体を含有することができる。注射のための無菌粗

ばアルコール(たとえばエタノールなど)、ポリアルコ ウムなど) などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえ ば、Dーソルピトール、Dーマンニトール、硫化ナトリ 塩水、ブドウ糖やその他の福助菜を含む苧張液(例え げられ、溶解補助剤として安息香酸ヘンジル、ヘンジル 用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などが ソルベート80 (TM)、HCO-50など) などと リコールなど)、非イオン性界面活性剤(たとえばず) ール (たとえばプロピレングリコール、ポリエチレング :【0061】注射用の水性液としては、例えば、生理食 エチレングリコールなど)、、保存剤(例えば、ベンジル 痛化剤 (例えば、塩化ペンザルコニウム、塩微プロカイ アルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合 ンなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリ ば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など)、無 アルコールなどと併用してもよい。また、想衝剤(例え 約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20m いては、一日につき約0. 1~100mg、好ましくは 毒性であるので、例えば温血哺乳動物 (例えば、ラッ に充填される。このようにして得られる製剤は安全で低 してもよい。 悶盤された注射液は通常、適当なアンプル 経口投与の場合、一般的に成人(60kgとして)にお たはその塩の投与阻は、症状などにより差異はあるが、 ヒトなど) に対して投与することができる。 核化合物ま ト、ウサギ、ヒッジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、

(2 (<u>9</u>

<u>2</u>

(22)

Bである。非経口的に投与する場合は、その1回投与出 は投与対象、対象機器、症状、投与方法などによっても 異なるが、たとえば注射剤の形では通常成人 (60kg として) においては、一日につき約0.01~30mg 程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好まし くは約0.1~10mg程度を静脈性射により投与する のが好部合である。他の動物の場合も、60kg当たり に換算した量を投与することができる。

になせていません。 「0062」(5) 本税明のC蛋白質状役型レセプター 日何をしくはその塩または本発明のC蛋白質状役型レ プター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する パネまたは近血液の製造

本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその 塩または本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質の部 分ペプチドもしくはその塩に対する抗体(例えば、ボリ クローナル抗体、モノクローナル抗体)または抗血消 は、本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくは その塩または本発明のC蛋白質共役型レセプター蛋白質 の部分ペプチドもしくはその塩を抗原として用い、自体 公知の抗体または抗血消の製造法に従って製造すること ができる。例えば、モノクローナル抗体は、後述の方法 に従って製造することができる。

(モノクローナル抗体の作製)

(a)モノクロナール抗体産生細胞の作製

本発明の6蛋白質共役型レセブター蛋白質もしくはその 塩または本発明の6蛋白質共役型レセブター蛋白質の部 分ペプチドもしくはその塩(以下、6蛋白質共役型レセ プターと略称する場合がある)は、温血動物に対して投 与により抗体産生が可能を部位にそれ自体あるいは相 体、希釈剤とともに投与される。投与に配して抗体産生 能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全 フロイントアジュバントを投与してもより。投与は適所 しられる温血動物としては、たとえばサル、ウサギ、イ ヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒッジ、ヤギ、コワ トリがあげられるが、マウスなおよびラットが好ましく用 [0063] モノクローナル抗体産生期間の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから 近体価の認められた個体を選択し環株免疫の2~5日後 に呼臨またはリンパ節を採取し、それらに含まれる近休 産生期間を存む面型に配合させることにより、モノク ローナル抗体値の間には、例えば後記の感謝化 近白質状役型レゼプターと抗血消とを反応させたのち、 近体に結合した疑惑剤の活性を測定することができ が一端を設体は既知の活性、例えば後記の極端化 がみインの方法 [ネイチャー(haure)、26。495 (195) に従い突縮できる。配合促進剤としては、メーチャー(haure)、26。495 (195) に従い突縮できる。配合促進剤としてはポリエチレングリコール(P.E.C) やセンダイウィルスなどが挙

た、好ましくは30~37561~10分間インキョス **ートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗** D, PEG (好ましくはPEG1000~PEG600 クリーニングには種々の方法が使用できるが、たとえば げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髄翅細 A P — 1 などがあげられるが、P 3 U 1 が好ましく用い られる。用いられる抗体産生細胞(降陽細胞)数と中極 随細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であ 0)が10~80%程度の徴度で添加され、20~40 G蛋白質共役型レセプター抗体産生ハイブリドーマのス G蛋白質共役型レセプター抗原を直接あるいは担体とと もに吸むさせた回섬(例、マイクロプレート)にハイブ リドーマ培養上滑を添加し、次に放射性物質や酵素など では臨した抗免疫グロブリン抗体、(細胞融合に用いられ る細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が 用いられる)またはプロテインAを加え、固相に結合し た抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検 出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインA 放射性物質や酵素などで感識した G 蛋白質共役型レセブ ターを加え、固相に結合した抗 G 蛋白質共役型レセプタ 間としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、 を吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、 ーモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられ

のような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好 ローン化されたハイブリドーマは、好ましくは無血液培 地中で培養され至適量の抗体をその上滑に与える。目的 40倍地 (大日本製薬(株))、1~10%の牛胎児自 イブリドーマ培養用無血清培培(SFM-101、日水 モノクローナル抗体は好ましく敗水化して得ることもで ル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に **従って行なうことができる。 通禁HAT(ヒポキサンチ** ン、アミノブテリン、チミジン)を添加した動物細胞用 培地で行なわれる。選別、クローニングおよび脊種用培 地としては、ハイピリドーマが生育できるものならばど ましくは10~20%の牛胎児血済を含むRPM116 潜を含むGIT培地(和光純楽工業(株))あるいはハ 通常20~40℃、好ましくは約37℃である。 結徴時 間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間で ある。培強は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイ プリドーマ培養上潜の抗体値は、上記の抗血清中の抗G 蛋白質共役型プセプター抗体価の測定と同様にして測定 できる。クローニングは、通常半固形アッガー法や限界 希釈法などのそれ自体公知の方法で行うことができ、ク 【0064】抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナ 製薬(株))などを用いることができる。培養温度は、

[0 0 6 5] (b) モノクロナール抗体の辯製 抗C蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の分離 精製は治常のポリクローナル抗体の分離結製と同様に免

8

DEAE)による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗 などの活性吸塑剤により抗体のみを採取し、結合を解離 させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行われる。以 明のC蛋白質共役型レセプター抗体は、C蛋白質共役型 る。すなわち、本発明は、例えば、(1)本発明のC強 校グロブリンの分酪幇殴法 [函、塩枦法、アルコール法 上の(a)および(b)の方法に従って製造される本発 レセプターを特異的に認識することができるので、被検 後中のC 蛋白質共役型レセプターの定品、特にサンドイ 白質共役型レセプターに反応する抗体と、被検液および 性を測定することを特徴とする被検液中のG蛋白質共役 不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるい は連続的に反応させたのち、不洛化担体上の模類剤の活 共役型レセプターのN略部を認識する抗体で、他方の抗 体がC蛋白質共役型レセプターのC端部に反応する抗体 であることを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセ 原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインG 核抗体に結合した模類化C 蛋白質共役型レセプター の割合を測定することを特徴とする被検液中のC蛋白質 共役型レセプターの定量法、(1-1)被検液と担体上に 型レセプターの定量法において、一方の抗体が6蛋白質 **敬法、等程点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体(例、** ッチ免疫測定法による定量などに使用することができ **標識化C蛋白質共役型レセプターとを競合的に反応さ** プターの定債法を提供する。

效出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分 【0066】本発明のG蛋白質共役型レセプターを認識 **共役型フセプター図)に対応した抗体、
扩原もしくは抗** 体一抗原複合体の畳を化学的または物理的手段により検 た環準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定 は、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネ するモノクローナル抗体(以下、抗C蛋白質共役型レセ プター抗体と称する場合がある)を用いてG蛋白質共役 型レセプターの測定を行なえるほか、組織染色等による い。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるペ きものではなく、被測定液中の抗原型(例えばC蛋白質 出し、これを既知盟の抗原を含む協學液を用いて作製し イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用い られるが、怒度、特異性の点で、後述するサンドイッチ 法を用いるのが特に好ましい。 概蔵物質を用いる測定法 蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素 [* C] などが、上記酵素としては、安定で比话性の大 きなものが好ましく、例えばB-ガラクトシダーゼ、B ーグルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオ キシダーゼ、リンゴ鉱脱水素酵素等が、蛍光物質として としては、例えば [tb 1] 、 [th 1] 、 [th H] 、 子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a **法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、** b')2、Fab、あるいはFab画分を用いてもよ に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素

一トなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール・が様耳体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれぞれずげられる。さらに、抗体あるいは抗原と機類剤との結合にピオチンーアビジン系を用いることもできる。

を不洛化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる 方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラ ン、セルロースなどの不裕性多糖類、ポリスチレン、ポ リアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガ の様似的の活性を測定することにより被検液中のC蛋白 **芯と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行な** ってもよいし時間をずらして行なってもよい。媒質化剤 の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。本 理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等 ラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不裕化 した抗C蛋白質共役型レセプター抗体に被核液を反応さ せ(1 次反応)、さらに様闆化抗G蛋白質共役型レセプ ター抗体を反応させ(2次反応)たのち、不符化担体上 質共役型レセプター届を定盟することができる。1次反 および不裕化の方法は前記のそれらにゆじることができ しも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等 固相用抗体あるいは想識用抗体に用いられる抗体は必ず る。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、 【0067】 抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、

抗 C 蛋白質共役型レセプター抗体は G 蛋白質共役型レセ の測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる プターの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いら れる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体 は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、G蛋白質共 リコール、前配抗体に対する第2抗体などを用いる液相 発明のサンドイッチ法によるC蛋白質共役型レセプター 役型レセプターのC蟷邸を認識する場合、1次反応で用 いられる抗体は、好ましくはC蟷部以外、倒えばN蟷部 イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用い 原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の **法、および、第1 抗体として固相化抗体を用いるか、あ** トリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定 化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え来反応の標 【0068】本発明のC蛋白質共役型レセプター抗体を ることができる。観合法では、故故液中の抗原と様臨抗 **関戯抗原と(F)と抗体と結合した模型抗原(B)とを** 分離し(B/F分類)、B,Fいずれかの繁質量を過定 し、被検液中の抗原盤を定置する。本反応法には、抗体 として可治性抗体を用い、B/F分粒をポリエチレング **団相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメ** 並の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を **分離するか、あるいは、故検液中の抗原と過剰畳の感蓋 数化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離す** るいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として サンドイッチ法以外の副定システム、例えば、競合法、 を認識する抗体が用いられる。 8

の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用 物の鼠を測定する。被検液中の抗原品僅かであり、少鼠 るいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降 原母を定団する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内を る。次に、いずれかの相の標識頭を測定し被検液中の抗 定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。 【0069】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測

オイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、 入江 5の一般的な技術手段の詳細については、総説、成春な 白質共役型レセプターの測定系を構築すればよい。これ 条件、操作法に当载者の通常の技術的配慮を加えてG蛋 設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の 6 2年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY J Vol. 70(Im 治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学費院、昭和 法」(第2版)(医学傳院、昭和57年発行)、石川栄 院、昭和53年発行)、石川栄治ら掲「酵素免疫測定 年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学啓 どを参照することができる〔例えば、入江 寛福「ラジ unochemical Techniques(Part C)) 、同春 Vol. 84(Imm munochemical Techniques(Part A))、同套 Vol. 73(Imm thods))、同都 Vol. 121(Immunochemical Techniques s)) 、同個 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part unochemical Techniques(Part B)) 、同替 Vol. 74(Im E:Nonoclonal Antibodies and General Immunoassay Ne unochemical Techniques(PartD:Selected Immunoassay (Part I:Nybridoma Technology and Monoclonal Antibo 寛穏「続ラジオイムノアッセイ」(路牍社、昭和54

dies)) (以上、アカデミックプレス社発行) など参 照)。以上のように、本発明のG蛋白質共役型レセプタ **一抗体を用いることによって、G蛋白質共役型レセプタ** (6) 本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコー -を感度良く定置することができる。

いるのが一般に有利である。たとえば、ウサギにG蛋白 ランジェニック動物を作製することができる。動物とし 用いて、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現するト G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを 質共役型レセプター蛋白質 DNAを導入する場合、これ 物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合して用 る。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDN ては、温血哺乳動物(例えば、ラット、ウサギ、ヒツ ドするDNAを有する動物の作製 の下流に結合した遺伝子コンストラクトを、対象動物の と相同性が高い動物由来のC蛋白質共役型レセプター蛋 Aを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動 ジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど)が挙げられ ョンすることによってG蛋白質共役型レセプター蛋白質 受精卵、たとえばウサギ受精卵へマイクロインジェクシ 白質DNAを動物細胞で発現させうる各種プロモーター

> 物の胚芽細胞においてG蛋白質共役型レゼプター蛋白質 精卵細胞段階におけるC蛋白質共役型レセプター蛋白質 やエノラーゼ退伝子プロモーターなどが用いられる。受 るいは肺で特異的に発現するNCF遺伝子プロモーター スな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳あ ルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキタ DNAの転移は、対象動物の胚芽細胞および体細胞の全 を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の および体細胞の全てにG蛋白質共役型レセプター蛋白質 が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞 てに存在するように確保される。 DNA転移後の作出動 【0070】 このプロモーターとしては、たとえばウイ 安定に保持することを確認して、該DNA保有動物とし セプター蛋白質DNA導入動物は、交配により遺伝子を 質共役型レセプター蛋白質を有する。 C 蛋白質共役型レ 動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てにG蛋白 が導入された動物は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質 より、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴ に、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することに て通常の飼育環境で飼育様代を行うことができる。さら ター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストの が高発現させられているので、該G蛋白質共役型レセプ ことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質DNA りすべての子孫が該DNAを有するように緊痛継代する ―ト動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによ スクリーニング用の動物などとして有用である。

導入マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析 質について分析することができる。C蛋白質共役型レセ するかあるいは遺伝子により発現されたタンパク質組織 細胞源として使用することもできる。 たとえば、遺伝子 由来のような一般に培養困難な組織からの細胞、さらに 発現抑胞株があれば、そこから、G蛋白質共役型レセフ 機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高 た、その細胞を用いることにより、たとえば各種組織の らの細胞のそれぞれの機能を研究することができる。ま は肺細胞や肺組織由来のような一般に培養困難な組織か より培養し、これらを使用して、たとえば脳や末梢組織 プター蛋白質を有する組織の細胞を標準組織培養技術に を分析することにより、G蛋白質共役型レセプター蛋白 【0071】この遺伝子導入動物を、組織培養のための ター蛋白質を単離精製することも可能である。

伝子の複製を阻害することのできるアンチセンスDNA 本発明に従えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝 【0072】(7)G蛋白質共役型レセプター蛋白質過 (又はオリゴヌクレオチド)

いは決定されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコー ドするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しう 子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス ・オリゴヌクレオチド (核酸) を、クローン化したある

を高産生する遺伝子導入 (トランスジェニック) 動物を

などとハイブリダイズすることができ、該DNAあるい 共役型レセプター蛋白質遺伝子のDN AあるいはRN A る。そうしたオリゴヌクレオチド(核酸)は、G蛋白質 はRNAなどの合成、発現又は機能を阻害することがで きるか、あるいはC蛋白質共役型レセプター蛋白質関連 に相補的なオリゴヌクレオチド、及びG蛋白質共役型レ 白質共役型レセプター蛋白質関連核酸の選択された配列 白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。C産 核酸との相互作用を介してG蛋白質共役型レセプター蛋 の間で「対応する」とは、ヌクレオチド (核酸) の配列 クレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド(蛋白質)と 同性を有するあるいは相補的である。ことを意味する。ヌ めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相 診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含 節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は 外でG蛋白質共役型レセプター蛋白質遺伝子の発現を調 ることができるオリゴヌクレオチドは、生体内及び生体 セプター蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズす セプター蛋白質遺伝子の5、塩ヘアピンループ、5、塩 白質)のアミノ酸を通常指している。 G蛋白質共役型レ 又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド(蛋 開始コドン、3、端非翻訳領域、3、端パリンドローム 6ースースペア・リヒート、5、端非朗釈領域、ポコス 伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。 領域、及び3、端ヘアピンループは好ましい対象領域と プチド朝駅開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻駅 して選択しうるが、G蛋白質共役型レセプター蛋白質遺

は、2'ーデオキシーDーリボースを含有しているポリ ヌクレオチドは、対象物と「アンチセンス」であるとい 相補的あるいはハイブリダイズすることができるオリゴ Nーグリコシドであるその他のタイプのポリスクレオチ リデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基の うことができる。 アンチセンス・オリゴヌクレオチド れらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、2本鎖RNA、 をもつヌクレオチドを含有する)、などが挙げられる。そ るような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置 核酸ポリマー)又は特殊な結合を含有するその他のポリ マー(例えば、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な ド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリ デオキシヌクレオチド、D-リボースを含有しているボ 【0073】目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に ャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の たもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キ ることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド又は非修 ば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホ クレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合(例え 天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌ 飾オリゴヌクレオチド、さらには公知の複飾の付加され 1本鎖RNA、さらにDNA:RNAハイブリッドであ (但し、該ポリマーはDNAやRNA中に見出され

> 蛋白質(ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、 有する結合又は硫黄含有結合(例えば、ホスホロチオエ ロアミデート、カルバメートなど)を持つもの、昭荷を 素、酸化性の金属など)を含有するもの、アルキル化 ば、アクリジン、プッラレンなど)を持つもの、キレー 鎖基を有しているもの、インターカレント化合物(例え など) や額 (例えば、モノサッカライドなど) などの側 トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーLーリジン ート、ホスホロジチオエートなど)を持つもの、例えば を含有するもの、修飾された結合を持つもの(例えば) 知のプリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、 ト化合物(例えば、金属、放射活性をもつ余属、ホウ り、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換され 酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていた また糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水 修飾されたヌクレオシド及び修飾されたヌクレオチドは ン、あるいはその他の複素環を含むものであってよい。 ン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジ んでいて良い。こうした修飾物は、メチル化されたプリ 修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含 クレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、公 αアノマー型の核酸など)であってもよい。ここで「ヌ

明のアンチセンス・オリゴヌクレオチドは次のような方 が挙げられるが、それに限定されるものではない。本発 る。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体 チセンス・オリゴヌクレオチドをより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目とするセンス額に対する親和性をより大きなものにす ミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のもの やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドア ドは、RNA、DNA、あるいは修飾された核散であ ense Research and Applications, CRC Press, 1993& ol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antis 飾は当該分野で数多く知られており、例えばJ. Kawakam る、そしてもし母性があるならアンチセンス・オリゴヌ 針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアン [0074] 本発明のアンチセンス・オリゴヌクレオチ 結合などを含有していて良く、リポソーム、ミクロスフ どに開示がある。本発明のアンチセンス・オリゴヌクレ i et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; V クレオチドの群性をより小さなものにする。 こうした修 オチドは、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、 を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質 リリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用 としては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポ ることができうる。」こうした付加形態で用いられるもの 適した形態で適用されたり、付加された形態で与えられ ェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療に (例えば、ホスホリピッド、コレステロールなど)

(24)

特開平9-121865

n I D d Asp H s Phe Tyr Тгр Pro Asn Gln Meı Lys 体内や生体外の解散系を用いて悶べることができる。絃 アリコールをはじめとした当核分野で知られた水餃基の った和水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂 れる。こうしたものは、核酸の3、端あるいは5、端に しては、核酸の3、端あるいは5、端に特異的に配置さ eなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのもの チレングリコール、テトラエチレングリコールなどの 発現系、あるいはC蛋白質共役型レセプター蛋白質の生 **灯としては、コレステロールやその観導体(例えば、コ** レステリルクロロホルメート、コール敬など)が挙げら 付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド 結合を介して付益させることができうる。 その他の基と れたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNas 挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリ 本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子 **保飯基が挙げられるが、それに限定されるものではな** い。アンチセンス・オリゴヌクレオチドの阻省活性は、

【0075】本明細掛および図面において、塩基やアミ Commission on Biochemical Nomenclature による路母あ その例を下記する。またアミノ敬に関し光学異性体があ り得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとす るいは当絃分野における慣用略号に基づくものであり、 / 酸などを略号で投示する場合、10PAC-10B

: 柏描的デオキシリボ核酸 :デオキシリボ核酸 アデニン ガアニン シトシン チョン [0076] c D N A DNA

・リボ核酸 mRNA

デオキシアデノシン三リン徴 **デオキシグアノシン三リン**酸 デオキシチミジン三リン酸 メッセンジャーリボ核酸 dATP dTTb d C T D

デオキシシチジン三リン数 アデノシンニリン数 **dCTP** ATP

リン扩イセイイノアッカイ エチレンジアミン四酢酸 ドデシル硫酸ナトリウム グリシン EDTA SDS EIA C I y

インロイツン アラニン ロイツン ・バリン Va I l. e u 1 l e Ala

センソ

[0077]

アスパラギン酸 グルタミン酸 システイン メヤイニン シジン

フェニルアラニン ヒスチジン ・チロシン

アルギニン

: トリプトファン プロシン

ピログルタミン酸 アスペルポン グルタミン

メチル基 エチル基

フェニル基 プチル基

オリゴヌクレオチド其れ自体公知の各種の方法で細胞に

チアゾリジンー4 (R) ーカルボキ サミド基

15878として寄託されている。後述の実施例6で得 られた形質転換体エシェリヒア コリ (Escherichia co 11) JM109/pPLBS003は、平成7年9月2 9日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (NIBH) に容託毎号FERM BP-5254とし て寄託されており、また平成7年9月26日から財団法 は、平成7年9月29日から通商産業省工業技術院生命 BP-5253として容託されており、また平成7年9 人発酵研究所 (1FO) に1FO 15879として省 U (Escherichia coli) JMI09/pPBBS002 工学工業技術研究所 (NIBH) に寄託毎号FERM 月26日から財団法人発酵研究所 (1FO) に1FO 後述の実施例3で得られた形質転換体エシェリヒア 託されている。

説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものでは ない。当業者には本件の開示をみれば、その特許勘求の 【実施例】以下に実施例を示して、本発明をより群細に 節囲の内で各種の具体的な実施の形態が明らかとなろ

【参考例】G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードす るDNAを増幅させるための合成DNAプライマーの製 [0078]

\$

ラニンレセプター(H D M C A L A R E C)、ラット由 来a-18-アドレナジックレセプター (RATADR 公知のG蛋白質共役型レセプター、すなわちヒト由来ガ (HUMADRB1) 、ウサギ由来1L-8レセプター (RABIL8RSB)、ヒト由来オピオイドレセプタ 1 B) 、ヒト由来β-1-アドレナジックレセプター

8

レセプター(BTSKR)、ヒト由来ソマトスタチンレ セプター-2 (HUMSRI2A)、ヒト由米ソマトス タチンレセプターー3 (HUMSSTR3Y)、ヒト由 来ガストリンレセプター(H UMGARE)、ヒト由来 T1E)、ヒト由来ドバミンレセプターD4 (HUMD 4 C) 、マウス由来セロトコンレセプターー2 (MMS 近のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を比較 し、類似性の高い部分を見いだした。上記の()内の (CD019、日立ソフトウエアエンジニアリング) を - (HUMOPIODRE)、ウン由来サブスタンスK **ヒト田米セロトニンフセプター5HT1E(HDM5H** ERO)、ラット由来aー1Aーアドレナジックレセプ ター (RATADRAIA)、ラット由来ヒスタミンH 略語はDNASIS Gene/Protein シークエンスデータベース 用いて GenBank/EMBL Data Bank を検索した際に示され る盤理番号であり、それぞれ通常Accession Numberおよ 2レセプター (S 5 7 5 6 5) などの第 2 膜斑通領域付 コレシストキニンAレセプター (HUMCCKAR)、 ヒト由来ドバミンレセプター-D5 (HUMD18) びエントリーネームと呼ばれるものである。

M)、ラット由来バスキュラータイプ I アンジオテンシ 一、すなわちヒト由来ガラニンレセプター(HUMGA (RATIADREC)、プタ由来アンジオテンシンレ セプター (PIGA2R)、ラット由来セロトニンレセ プター(RAT5HTRTC)、ヒト由来ドバミンレセ ングペプチドレセプター(HUMGRPR)、マウス由 リニックアセチルコリンレセプター (H S HM 4) 、 と セプター1 (MUSSR11A)、ヒト由来α-A1-アドレナジックレセプター (HUMA1AADR)、マ SSTR3Y) などの第7膜質通領域付近のアミノ酸配 列をコードする DNA の塩基配列を比較し、類似性の高 い部分を見いだした。上記の () 内の略語はDUASIS C ンレセプター (RRVT1A11R)、ヒト由来ムスカ ト由来β-1アドレナジックレセプター(HUMDRB E)、ラット由来コレシストキニンレセプター (RAT CCKAR)、ラット由来リガンド不明レセプター(S 一(RNGPROCR)、マクス由来ソマトスタチンレ 1) 、ヒト由来ソマトスタチンレセプター-3(H U M プター (S58541) 、ヒト由来ガストリンリリーシ 59748)、ヒト由来ソマトスタチンレセプター (H UMSST28A)、ラット由来リガンド不明レセプタ 日立ソフトウエアエンジニアリング)を用いて GenBank /EURL Data Bank を検索した際に示される整理番号であ ene/Protein シークエンスデータベース (CD019, 米CRP/ボンくシンフセプター (MUSGRPBO 1)、ヒト由来ガストリンレセプター(HUMGAR LAREC)、ラット由来A1アデノシンレセプター ウス由来デルタオピオイドレセプター (56618

を計画した。この配列をもとに、共通する塩基配列に相 −ムと呼ばれるものである。特に、多くのレセプター街 白質をコードする c D N A で一致する塩基部分を基準と し、その句の哲公行はいてもなる人へ多人のフセプター c DNAと配列の一致性を高めるために混合塩嶅の抑入 補的である配列番号:5 (T2A)または配列番号:6 (T7A)で扱わされる塩基配列を有する合成DNAを 作成した。

【0080】配列番号:5(T2A プライマー)で表 わされる塩基配列は、5′ — G Y C A C C A A C N 2 W たはCを示し、YはCまたはTを示し、WはAまたはT ()内は合成時に複数の塩基に混合して合成する。た STTCATCCTSWN2 HCTG-3. (SIGCE を示し、HはA、CまたはTを示し、N2 は1を示す。 だし、1はイノシンである。」である。

【0081】配列番号:6 (T1A プライマー) で表 わされる塩基配列は、5'-ASN:SAN:RAAG AまたはGを示し、SはGまたはCを示し、N2 は1を 示す。() 内は合成時に複数の塩基に混合して合成す SARTAGAN, GAN, RGCRTT-3' (RIL る。ただし、「はイノシンである。」である。 【実施例1】ヒト脳由来 poly(A)・RNA画分からの c DNAの合成

[0082]

[0079] さらに、公知のG蛋白質共役型レセプタ

5瞬入した。 購入した poly(A)・RNA 画分5 μgに 社)を加え、モロニイマウス白血였ウイルスの逆転写辞 発 (BRL社) により、添付パッファーを用いて相補D N Aを合成した。反応後の確物はエタノール沈殿を行っ た後、30μ1のTE (Tris-EDTA solution; 10ml Tri ヒト脳由来 poly(A)・RNAは、和光矩斑体式会社か プライマーとしてランダムDNAへキサマー (BRL s-IIC1 (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0))に浴解した。 【奥施例2】ヒト脳由来c DNAを用いたPCR法によ る受容体cDNAの増幅

[0083]

実施例1でヒト届より類型したc DNA3μ1を紡型と して使用し、上記参考例で合成したT2A、T7AのD NAプライマーを用いてPCR法による増幅を行った。 **反応液の組成は、核合成DNAプライマー各100p**

M. O. 25 mMdNTPs (Deoxyribonucleotide tr 1 μ 1 および辞紫に付属の 1 0×T a q パッファー 1 0 μ1で、総反応浴液盤は100μ1とした。増幅のため 社)を用い、96℃・30秒、45℃・1分、60℃・ 3分のサイクルを25回繰り返した。Taq DNA p olymerase を添加する前に、残りの反応液を混合し、9 のサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色 5℃・5分の加熱を行った。増幅産物の確認は1.2% iphosphates)、Taq DNA polymerase (宝酒造) â

によって行った。

り、それぞれ通常Accession Numberおよびエントリーネ

レクトロエリューションアガロースゲルを用いて分類 実施例2で行なったPCR後の反応産物は1.2%のエ による新規レセプター蛋白質候補クローンの選択 クローニングおよび挿入 c D N A 部分の塩基配列の解読 【実施例3】 P C R 産物のプラスミドベクターへのサフ

酒遺株式会社)に導入して形質転換したのち、cDNA 処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpC フェノール柚出、エタノール沈殿を行ってDNAを回収 し、パンドの部分をカミソリで切り出した後、熱融解 挿入断片を持つクローンをアンピシリン、インプロピル R™ II(TMは登録商標を意味する)へサブクローニン した。TAクローニングキット (インピトロゲン社) の i agar medium)中で選択し、白色を呈するクローンのみ ロモー 4…クロロー3ーインドリルーβーDーガラクト チオーβ-D-ガラクトシド(1 P T G)および5-ブ グした。これを大腸菌JM109 competent cell (宝 い、挿入されている c D N A 断片の大きさを確認した。 BS002を得た。個々のクローンをアンピシリンを含 リヒア コリ (Escherichia coli) JMIO9/pPB を滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体エシェ シド(Xーgal)を含むLB察天培地(Luria-Bertan NASIS(日立システムエンジニアリング社)を用い ステムズ社:ABI社)を用いて行い、蛍光式自動シー inator Cycle Sequencing Kit (アプライド・バイオシ ル・クロロフォルム抽出し、エタノール沈殿によって微 残りのDNAの一部をさらにRN-ase処理、フェノー したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行 ラボウ社)を用いてプラスミドDNAを調製した。調製 むLB培地で一晩培益し、自動プラスミド抽出装置(ク 02の保有するプラスミドに挿入されたcDNA断片が モロジー検索を行なった結果、形質転換体エシェリヒア 基配列 (配列番号:3(図1の塩基配列)] をもとにホ いた合成プライマーに相当する部分である。決定した塩 て行った。図1において下線で示した部分はPCRで用 ケンサーを用いて解読し、得られた塩基配列の解析はD 縮した。塩基配列の決定のための反応は DyeDeoxy Term л) (Escherichia coli) JM109/pPBBS0

Accession Numberまたはエントリーネームと呼ばれるも

【実施例4】ヒト肺由来 poly(A) · RNA画分からの

マウス白血病ウイルスの逆転写酵素(BRL社)によ た poly(A)・ RNA画分5μgにプライマーとしてラ ヒト肺由来 poly(A) ・ R N Aは、クローンテック社 ンダムDNAヘキサマー (BRL社) を加え、モロニイ (Clontech Laboratories, USA) から購入した。購入し E (Tris-EDTA solution; 10mM Tris-HC1 (pH 8.0), 1m 応後の産物はエタノール沈殿を行った後、30 μ l のT り、添付パッファーを用いて相補DNAを合成した。反

W EDTA (pH 8.0))に答解した。

る受容体 c D N A の増幅 【実施例5】ヒト肺由来 c DNAを用いたPCR法によ

のDNAプライマーを用いてPCR法による増幅を行っ 造)1 μ l および酵素に付属の10×Taqパッファー e triphosphates)、Taq DNA polymerase (宝酒 pM, 0. 25mM dNTPs (Deoxyribonucleotid 型として使用し、上記参考例で合成したT2A、T7A 実施例4でヒト肺由来より調製したcDNA3μlを飼 産物の確認は1.2%アガロースゲル電気泳動およびエ し、95℃・5分、65℃・5分の加熱を行った。増幅 A polymerase を添加する前に、残りの反応液を混合 で・3分のサイクルを25回繰り返した。Taq DN マー社) を用い、96℃・30秒、45℃・1分、60 ためのサイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エル た。反応液の組成は、核合成DNAプライマー各100 10 μ 1 で、総反応裕液量は100 μ 1 とした。増幅の チジウムプロミド染色によって行った。

[0087]

実施例5で行なったPCR後の反応産物は1.2%のエ による新規レセプター蛋白質候補クローンの選択 クローニングおよび挿入 c D N A 部分の塩基配列の解読 処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpC フェノール抽出、エタノール沈殿を行ってDNAを回収 し、パンドの部分をカミソリで切り出した後、熱融解 レクトロエリューションアガロースゲルを用いて分離 ロモー4ークロロー3ーインドリルーβーDーガラクト チオーβーDーガラクトシド(I P T G)および5ーフ 挿入断片を持つクローンをアンピシリン、インプロピル 酒造株式会社)に導入して形質転換したのち、 c D N A グした。これを大腸菌JM109 competent cell (宝 R™II(TMは登録商標を意味する)へサブクローニン した。TAクローニングキット (インピトロゲン社) の 【実施例 6】 P C R 産物のプラスミドベクターへのサブ

列をアミノ酸配列に変換した (配列番号:1 (図1のア が分かった。それをさらに確認するために、DNASI

S (日立システムエンジニアリング社)を用い、塩基配 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすること

酸配列に基づくホモロジー検索を行ない、ヒトのソマト

ヒトのソマトスタチンレセプター・サブタイプ2(P 3

T にデータとして登録される際の整理番号であり、通常 ブタイプ3 (P32745) との相同性を見いだした 0874) およびヒトのソマトスタチンレセプター・サ スタチンレセプター・サブタイプ1 (P30872)、 ミノ敵配列))。疎水性プロット(図2)およびアミノ

i agar medium)中で選択し、白色を呈するクローンのみ

シド(Xーgal)を含むLB寒天焙地(luria-Bertar

[図3]。上記の()内の略語は、NBRF-PIR/Swiss-PRO

いた合成プライマーに相当する部分である。決定した塩 inator Cycle Sequencing Kit (アプライド・バイオシ 縮した。塩基配列の決定のための反応は DyeDeoxy Term 残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノー い、挿入されている c DN A断片の大きさを確認した。 ラボウ社)を用いてプラスミドDNAを調製した。調製 むLB培地で一晩培養し、自動プラスミド抽出装置(ク BS003を得た。 個々のクローンをアンピシリンを含 リヒア コリ (Escherichia coli) JM109/pPL ステムズ社:ABI社)を用いて行い、蛍光式自動シー ル・クロロフォルム抽出し、エタノール沈殿によって濃 したDNAの一部を用いてEcoRlによる切断を行 を滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体エシェ モロジー検索を行なった結果、形質転換体エシェリヒア 基配列〔配列番号:4(図4の塩基配列)〕をもとにホ NASIS(日立システムエンジニアリング社)を用い ケンサーを用いて解読し、得られた塩基配列の解析はD て行った。図4において下線で示した部分はPCRで用 יוב) (Escherichia coli) JMIO9/pPLBSO

新規C蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすること ミノ酸配列)]。疎水性プロット〔図5〕およびアミノ 列をアミノ酸配列に変換した〔配列番号:2(図4のア S (日立システムエンジニアリング社)を用い、塩基配 が分かった。それをさらに確認するために、DNASI 03の保有するプラスミドに挿入されたcDNA所片が スタチンレセプター・サプタイプ2 (P30874)、 酸配列に基づくホモロジー検索を行ない、 ヒトのソマト

> ROT にデータとして登録される際の整理番号であり、通 プタイプ1 (P30,872) との相同性を見いだした 2745) およびヒトのソマトスタチンレセプター・サ ヒトのソマトスタチンレセプター・サブタイプ3 (P3 ものである。 常Accession Numberまたはエントリーネームと呼ばれる [図6]。上記の()内の略語は、NBRF-PIR/Swiss-P

質および核蛋白質をコードするDNAは、①本発明の 定、②抗体および抗血清の入手、③組換え型レセプター ユニークな医薬品の開発につながる。 におけるプロープ、P.C.Rプライマーの作成、②遺伝子 結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニ 蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたレセプター 蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決 治療等に用いることができる。特に、 6 蛋白質共役型の 較にもとづいたドラッグデザインの実施、⑥退伝子診断 ング、⑤構造的に類似したリガンド・レセプターとの比 レセプターの協造・性質の解明はこれらの系に作用する 【発明の効果】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白

[6800]

配列の長さ:223 【配列番号:1】

配列の型:アミノ酸

配列の種類:ペプチド トポロジー: 直鎖状

Asp Phe Leu Leu Arg Gln Trp Pro Phe Gly Glu Leu Met Cys lys Leu Ala Ile Ala Asp Glu Leu Phe Thr Leu Val Leu Pro Ile Asn Ile Ala

Ile Val Ala Ile Asp Gln Tyr Asn Thr Phe Ser Ser Leu Tyr Phe Leu

Thr Val Net Ser Ala Asp Arg Tyr Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Glu

Ser Arg Arg Val Val Gly Arg Thr Tyr Ser Ala Ala Arg Ala Val Ser Leu Ala Val Trp Gly Ile Val Thr Leu Val Val Leu Scr Phe Ala Val 95

Phe Ala Arg Leu Asp Asp Glu Gln Gly Arg Arg Gln Cys Val Leu Val

Phe Pro Cln Pro Clu Ala Phe Trp Trp Arg Ala Ser Arg Leu Tyr Thr 120 25

Leu Val Leu Gly Phe Ala Ile Pro Val Ser Thr Ile Cys Val Leu Tyr 140

Lys Ala Leu Glu Arg Ala Lys Lys Arg Val Thr Phe Leu Val Val Ala Thr Thr Leu Leu Cys Arg Leu llis Ala Net Gly Leu Asp Ser llis Ala 170 175

(28)

g

(59)

lle Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Trp Thr Pro Tyr His Leu Ser Thr Val Val Ala Leu Thr Thr Asp Leu Pro Cln Thr Pro Leu Val Ile Ala

205

500.

195

· ;

F .

ncyy Ala Val Ala Asp Gly Leu Phe Thr Leu Val Leu Pro Val Asn Ile Ala Olu His Leu Leu Cin Tyr Trp Pro Phe Ciy Giu Leu Leu Cys Lys Leu :

・配列の種類:ペプチド

トポロジー: 直鎖状

Val Leu Ala Val Asp His Tyr, Asn Ile Phe Ser Ser Ile Tyr Phe Leu

\$

Ala Val Met Ser Val Asp Arg Tyr Leu Val Val Leu Ala Thr Val Arg

Ser Arg His Net Pro Trp Arg Thr Tyr Arg Cly Ala Lys Val Ala Ser Leu Cys Val Trp Leu Cly Val Thr Val Leu Val Leu Pro Phe Phe Ser

Phe Ala Gly Val Tyr Ser Asn Glu Leu Gln Val Pro Ser Cys Gly Leu Ser Phe Pro Trp Pro Glu Gln Val Trp Phe Lys Ala Ser Arg Val Tyr 2 50

Thr Leu Val Leu Gly Phe Val Leu Pro Val Cys Thr Ile Cys Val Leu 120

Tyr Thr Asp Leu Leu Arg Arg Leu Arg Ala Val Arg Leu Arg Ser Cly 8

8

Ala Lys Ala Leu Cly Lys Ala Arg Arg Lys Val Thr Val Leu Val Leu Val Val Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Trp Thr Pro Phe His Leu Ala 175

Ser Val Val Ala Leu Thr Thr. Asp Leu Pro Cln Thr Pro Leu Val Ile Ser Met Ser Tyr Val 11e Thr Ser Leu Ser Tyr Ala Asn Ser Cys . . 185 8

筋の数:二本質

ē

配列の長さ:669 [配列番号:3] [000]

特徴を決定した方法:S

・配列の種類: c.DNA.

40. トポロジー: 直鎖状

配列の型: 核酸

88 240 8 360 420 TOCCCCCCA CCCCCTTTA CACCCTCCT CTCCCCTTC CCATCCCCT CTCCACCATC COCCACTICOC COTTCOCGO COTCATOTIC ANGOTCATOS TOGOTATICA COAGTACAAC CTGGCCCTCT GGGGGATCCT CACACTCCTC CTGCTGTCCT TCGCAGTCTT CGCCCGGCTA CACCACCACC AGGCCCCCC CCACTCCCTC CTACTCTTTC CCCACCCCCA GCCCTTCTCC OCCATOGOCO ACCAGOTOTT CAGGOTOGIIG CTGCCCATCA ACATOGOCOGA CTTOCTGCTG ACCTITCTICCA CTCTCTACTT CCTCACCCTC ATCACCCCCC ACCCCTACCT CCTCCTICTTC CCCACTICCC ACTICCCCCC GCTGCTCGCT CCTACCTACA GTGCCGCGC CCCGCTGACC

540 8 99 TOTOTOCTION ATACCACCON GOTOTOCOCO CTOCATOCAA TOCOCOTOCA CACCCACOCO AAGCCCTGC ACCCCCAA CAAGCCCTG ACTITOCTGC TGCTGCCAAT CCTGCCGCTC TECCTECTET OCTEGACECE CTACEACETE AGGACOCTEG TEGEGETCAE CACEGACETE CCGCAGACGC CCCTCGTCAT CCCTATCTCC TACTTCATCA CCACCCTGAG CTACCCCAAC 特徴を決定した方法:S 配列の種類: c DNA トポロジー:直鎖状 間の数:二本館 NCCTOCCTC 配列の長さ:672 [配列番号: 4] 配列の型:核酸 [0092]

8 240 420 5 88 480 8 99 GCCTCGCCC ACGGCTCTT CACGCTGTA CTCCCCGTCA ACATCGCGGA GCACCTCCTC ATCHOTICTIC TICTACACAGA OCTICITICOS AGCITICOSOS COCTICIOSES COCTICIONA CTCTCCCTCC TCTCCTCCAC CCCTTTCCAC CTCCCCTCTC TCCTCGCCCT CACCACCGAC CACTACTICCE CCTTCCCCCA CCTCCTCTC AACCTCCTCC TCCCCCTCCA CCACTACAAC ATCTTCTCCA CCATCTACTT CCTACCCCTC ATCACCCTCC ACCCATACCT CCTCCTCCTC כתכתונתכת מכנונננמת כאכנותכת מדוכתכנכר זכותכתבוד כפכתנננכת TECTTCAAGE CEAGCECTET CTACACETTE GTECTGGGCT TECTGCTGCC CCCACCOTCA COTOCOCCCA CATGCCCTCC CCCACCTACC GGGGGGGGAA GCTCGGCAC PACAGCAACC ACCTGCAGGT CCCAACCTGT GGGCTGAGGT TCCCGTGGGC, CGAGCAGGTC CCCAACGCTC TAGGCAAGGC CAGGCGGAAG GTGAGCGTOC TGGTCCTCGT CGTCCTTGGC TECCECCAGA ECCEACTEGT CATEACTATE TECTACETEA TEACEAGEET CACCTAGGE VACTOCTCCC TC

8 23 配列の種類:他の核酸 合成DNA 配列の特徴: N2 は1を示す。 トポロジー:直鎖状 配列の長さ:27 [配列番号:5] 間の数:一本額 足列の型:核酸 [0093]

タイプ! (P30872)、ヒトのソマトスタチンレセ ブター・サブタイプ2 (P30874) およびヒトのソ

マトスタチンレセプター・サブタイプ3 (P3274

2. A A) を、ヒトのソマトスタチンレセプター・サブ

配列の種類:他の核酸 合成 DNA CYCACCAACN? WSTTCATCCT SWN2 HCTG トポロジー: 直鎖状 配列の長さ:27 [6] [1] [1] [1] [1] [1] 配列の型:核酸 鎖の数:一本鎖 [0094]

ASN2 SAN2 RAAG SARTAGAN2 CA N2 RGCRTT 【図面の簡単な説明】

配列の特徴:N2は1を示す。

27

れにコードされるアミノ敬配列を示す。下線で示した部 分はPCR増幅に用いた合成プライマーに相当する部分 [図1] ヒト脳よりPCR法によって得られた新規レセ プター蛋白質 c DNAクローン p P B B S 0 0 2 に含ま れるレセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列およびそ

【図2】図1に示したアミノ酸配列をもとに作成した、

レセプター蛋白質の疏水性プロットを示す。この図から [図3] pPBBS002にコードされる新規レセプタ -蛋白質 c D N A の部分アミノ酸配列 (p P B B S 0 0

5)の部分アミノ飯配列とを比較した図を示す。 黒く燈 【図4】ヒト時よりPCR法によって得られた新規レセ プター蛋白質 c D N A グローン p P L B S 0 0 3 に含ま れるレセプター蛋白質 c DNA断片の塩基配列およびそ れにコードされるアミノ敬配列を示す。下級で示した部 分はPCR増橋に用いた合成プライマーに相当する部分 った部分は一致しているアミノ散残基を示す。 C565

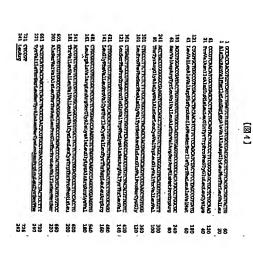
レセプター蛋白質の碳水性プロットを示す。この図から [図6] pPLBS003にコードされる節規レセプタ -蛋白質 c D N A の部分アミノ酸配列(p P L B S 0 0 タイプ2 (P30874)、ヒトのソマトスタチンレセ 3. A A)を、ヒトのソマトスタチンレセプター・サブ ブター・サブタイプ3 (P32745) およびヒトのソ 【図5】図4に示したアミノ敵配列をもとに作成した、 マトスタチンレセプター・サブタイプ1 (P3087 2~7で示す疎水性ドメインの存在が示岐される。 \$

2)の部分アミノ敬配列とを比較した凶を示す。 黒く塗 った部分は一致しているアミノ敵残基を示す。

BEST AVAILABLE COPY

ē

ğ



[図2]

CONTRIVENCE CONTRIVENCE AND	CONTROLLEGATION TO THE	May 174 120 121	661 TICATOACOG	201 ACCESSORIAN 109		181 CATOCAMOGG	121 Valificación 121 Valificación 121 Communicación 141 Clyphaniaií	01 The Type Surface 301 Charles The N			61 CONTONON
FORTESTICATION CONTRIBUTION CON			erlausertyrklakanse	atouth thrispleum	A STATE STATE STATE OF THE STAT	CHARLES THE BALLACE	mercial surface and the control of t	ahlakryhlevellerries harry reservos zwak evelthehlakrykenker	STYTE OVER 1 VALLE WAS	allekepülelyekenile	antimoperate and entire control of the control of t
			Tocoroucoccoccontroc CysleulgsProteuLeuTycBec	Olume Protected Lieutelle	Caudancy of print Property	A LOL MEGLIUNITA INI MEMBERA	Argalaser anglessystmates anglaser anglessystmates strong and anglessystmates mallessystmathstestes on	Alayal tapdly Liefa littles successor constructions Aspoint into Lykspany diacys	The Aleginder Argunday (value)	The Set Set Leutly: Phylouther	Chrisphophedlydlefeubet

A NYCAC AN ADDREDOUR THE MAN PARTY OF THE PA

8 8 8 8 8

[図1]

特開平9-121865

特開平9-121865

(32)

[図3]

(31)



(72) 発明者 藤井 亮 茨城県つくば市春日1丁目7番地の9 武 田春日ハイツ303号

(図5)

1.00 2 3 4 5 5 6 7

1.00 2 3 4 5 5 6 7

1.00 2 3 4 5 5 6 7

1.00 3 5 5 6 7

1.00 3 5 5 6 7

1.00 3 5 5 6 7

1.00 3 5 5 6 7

1.00 3 5 5 6 7

1.00 3 5 5 6 7

1.00 3 5 5 6 7

1.00 3 5 5 6 7

1.00 3 5 5 6 7

1.00 3 5 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 6 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5 7

1.00 3 5

技術表示箇所

BEST AVAILABLE COPY

(3<u>4</u>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

□ BLACK BORDERS
□ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
□ FADED TEXT OR DRAWING
□ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
□ SKEWED/SLANTED IMAGES
□ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
□ GRAY SCALE DOCUMENTS
□ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
□ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

☐ OTHER:

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)